

PET-kannabinoidimerkkiaineet

Pietari Huuskonen
Pro Gradu -tutkielma
Radiofarmaseuttinen kemia
Kemian laitos
Turun yliopisto
Kesäkuu 2021

*Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu
Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.*

TURUN YLIOPISTO

Kemian laitos

HUUSKONEN PIETARI: PET-kannabinoidimerkkiaineet

Pro Gradu -tutkielma, 41 s.

Kesäkuu 2021

Kannabinoidireseptorit ovat osa endokannabinoidijärjestelmää, joka muodostaa lipidipohjaisen signaalijärjestelmän ihmisen keskushermostossa. Erityisesti aivoissa esiintyvien CB1-reseptorien on todettu olevan osallisia erilaisissa fysiologisissa ja patologisissa toiminnoissa. CB1-reseptorit liittyvät myös neuropsykiatriisiin sairauksiin ja aivojen rappeumaan.

Positroniemissiotomografia on ei-invasiivinen ja erittäin herkkä menetelmä, jota on hyödynnetty CB1-reseptorien tutkimuksessa. Positroniemissiotomografia perustuu positroniemittoiviin radionuklideihin. PET-kannabinoidimerkkiaineissa on käytetty positroniemittovina radionuklideina hiili-11:tä ja fluori-18:aa. CB1-reseptorille on kehitetty useita PET-merkkiaineita, joista osaa on käytetty prekliinisissä ja kliinisissä tutkimuksissa. PET-kannabinoidimerkkiaineiden kehityksessä haasteena on useat niille asetetut vaatimukset, jotka ovat olennaisia onnistuneen kuvantamisen kannalta. Radioleimauksiin on käytetty useita menetelmiä, mutta siirtymävälitteinen ^{18}F -fluoraus on tarjonnut mahdollisuuden suoraviivaiseen ja tehokkaaseen merkkiaineiden radioleimaamiseen.

Tässä tutkimuksessa valmistettiin kuparivälitteistä ^{18}F -fluorausta varten trimetyylitinattu lähtöaine (3*R*,5*R*)-5-(3-trimetyylitannyyli-fenyyl)-3-[(*R*)-1-fenylylietyyliamino]-1-(4-trifluorimetyylifenyyl)-pyrrolidiini-2-oni. [^{18}F]Fluoridin aktivointiin käytettiin atseotrooppista tislausta ja kiinteäfaasiuuttoa ja verrattiin näiden [^{18}F]fluoridin aktivointimenetelmien vaikutusta ^{18}F -fluorauksen onnistumiseen. CB1-reseptoreille spesifinen radioligandi [^{18}F]FPATPP, (3*R*,5*R*)-5-(3- ^{18}F -fluorifenyyl)-3-[(*R*)-1-fenylylietyyliamino]-1-(4-trifluori-metyylifenyyl)-pyrrolidiini-2-oni valmistettiin onnistuneesti kuparivälitteisellä ^{18}F -fluorauksella käyttäen trimetyylitinattua lähtöainetta. Kuparivälitteinen ^{18}F -fluoraus on potentiaalinen vaihtoehto [^{18}F]FPATPP:n valmistamiseksi, mutta tutkimus jätti tilaa synteysin jatkokehitykselle.

Avainsanat: Kannabinoidireseptori, CB1R, positroniemissiotomografia, FPATPP, fluori-18, kuparivälitteinen ^{18}F -fluoraus

Sisällysluettelo

1. JOHDANTO	1
1.1. Kannabinoidireseptorit	1
1.1.1. Kannabinoidireseptorien toiminta	1
1.2. Positroniemissiotomografia	4
1.3. PET-merkkiaineet	4
1.4. PET-kannabinoidimerkkiaineet	7
1.4.1. (-)-5'-[¹⁸ F]-Δ ⁸ -THC	7
1.4.2. Rimonabanttiin pohjautuvia merkkiaineita	8
1.4.3. [¹⁸ F]MK-9470	9
1.4.4. [¹¹ C]SD5024	10
1.4.5. [¹¹ C]MePPEP	11
1.4.6. [¹⁸ F]FMPEP, [¹⁸ F]FMPEP- <i>d</i> ₂	13
1.4.7. [¹⁸ F]FPATPP	16
1.5. Leimausstrategiat	19
1.5.1. Siirtymämetallivälitteinen ¹⁸ F-fluoraus	21
1.6. Tutkimuksen tarkoitus	22
2. TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU	23
2.1. Lähtöaineen synteesi	23
2.2. Radioleimaus	25
3. JOHTOPÄÄTÖKSET	26
4. MATERIAALIT JA MENETELMÄT	27
4.1. Yleiset menetelmät	27
4.2. Lähtöaineen synteesi	27

4.2.1. 5-(3-Bromifenyyli)-1-(4-trifluorimetyylifenyyli)-3-(4-trifluorimetyylifenyyli-amino)-1,5-dihydropyrrol-2-oni (24)	27
4.2.2. 5-(3-Bromifenyyli)-1-(4-trifluorimetyylifenyyli)-pyrrolidiini-2,3-dioni (25)	27
4.2.3. (<i>R</i>)-5-(3-Bromifenyyli)-3-[(<i>R</i>)-1-fenyylietyyliamino]-1-(4-trifluorimetyylifenyyli)-1,5-dihydropyrrol-2-oni (26)	28
4.2.4. (3 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-5-(3-Bromifenyyli)-3-[(<i>R</i>)-1-fenyylietyyliamino]-1-(4-trifluorimetyylifenyyli)-pyrrolidiini-2-oni (27)	28
4.2.5. (3 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-5-(3-Trimetyylistannyyllifenyyli)-3-[(<i>R</i>)-1-fenyylietyyliamino]-1-(4-trifluorimetyylifenyyli)-pyrrolidiini-2-oni (23)	29
4.3. Radiokemian yleiset menetelmät	29
4.4. Radioleimaus	30
4.4.1. [¹⁸ F]FPATPP synteesi kiinteäfaasiuutolla	32
4.4.2. [¹⁸ F]FPATPP synteesi atseotrooppisen tislauksen menetelmällä	33
5. VIITTEET	34

Lyhenneluettelo

AcOH	Etikkahappo
A _m	Molaarinen aktiivisuus
AEA	Anandamidi
2-AG	2-Arakidonyyliyglyseroli
cAMP	Syklinen adenosiinimonofosfaatti
CB1R	Kannabinoidireseptori 1
CB2R	Kannabinoidireseptori 2
Celite [®]	Piidioksidi/silika
CH ₂ Cl ₂	Dikloorimetaani
CRIP1a	Kannabinoidireseptorin vuorovaikutusproteiini 1a
CRPI1b	Kannabinoidireseptorin vuorovaikutusproteiini 1b
Cu(OTf) ₂	Kupari(II)triflaatti
Cu(OTf) ₂ (py) ₄	Tetrakis(pyridiini)kupari(II)triflaatti
DMA	Dimetyyliasetamidi
DMF	Dimetyyliformamidi
DMSO	Dimetyylisulfoksidi
EC	Elektronikaappaus
EOB	Säteilytyksen loppu, End of bombardment
EOS	Synteesin loppu, End of synthesis
EtOAc	Etyyliasettaatti
FAAH	Rasvahappoamidihydrolaasi
FMPEP- <i>d</i> ₂	(3 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-5-(3-fluorimetoksi- <i>d</i> ₂)fenyyli)-3-[(<i>R</i>)-1-fenyylietyyliamino]-1-(4-trifluorimetyylifenyyli)-pyrrolidin-2-oni
GABA	Gamma-aminovoihappo
GMP	Hyvät tuotantotavat, Good Manufacturing Practice
HCl	Vetykloridi
HPLC	Korkean erotuskyvyn nestekromatografia, High Performance Liquid Chromatography
K ₂ CO ₃	Kaliumkarbonaatti
Kryptofix [®] K ₂₂₂	4,7,13,16,21,24-Heksaoksa-1,10-diatsabisyklo[8.8.8]heksakosaani
MAGL	Monoasyyliyglyserolilipaasi
MTBE	Metyyli-tert-butyylieetteri
NaBH ₃ CN	Natriumsyanoboorihydridi

NaHCO ₃	Natriumvetykarbonaatti
NaI	Natriumjodidi
NaCl	Natriumkloridi
NMR	Ydinmagneettinen resonanssi, Nuclear Magnetic Resonance
PET	Positroniemissiotomografia
(PPh ₃) ₂ PdCl ₂	Bis(trifenyylifosfiini)palladium(II)dikloridi
RCP	Radiokemiallinen puhtaus, Radiochemical purity
RCY	Radiokemiallinen saanto, Radiochemical yield
Sn ₂ (Me) ₆	Heksametyyliditina
SPE	Kiinteäfaasiuutto, Solid-phase extraction
SUV	Kertymäarvo, Standardized uptake value
TFA	Trifluoretikkahappo
THC	Tetrahydrokannabinoli
TLC	Ohutkerroskromatografia, Thin Layer Chromatography

1. Johdanto

1.1. Kannabinoidireseptorit

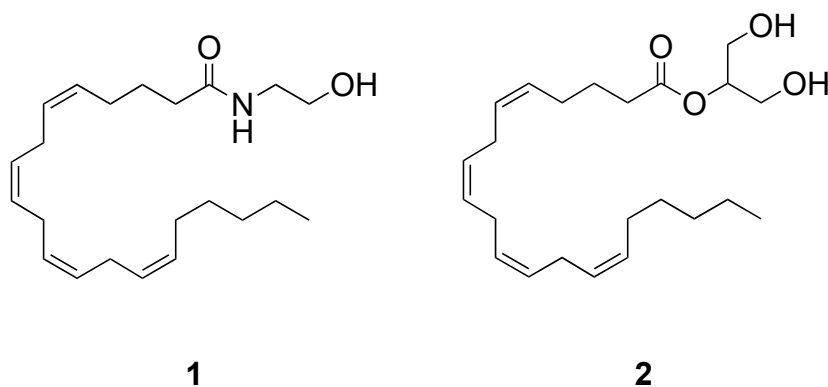
Kannabinoidireseptorit ovat osa endokannabinoidijärjestelmää, joka muodostaa lipidipohjaisen signaalijärjestelmän ihmisen keskushermostossa. Kannabinoidireseptorit on jaettu kahteen alaluokkaan, kannabinoidireseptori 1 (CB1R) ja kannabinoidireseptori 2 (CB2R).¹ CB1- ja CB2-reseptorit kuuluvat G-proteiinikytkettäisiin reseptoreihin, jotka koostuvat 7 transmembraanin domeenin rakenteista.¹⁻³ Molemmat reseptorit ovat kytkeytyneet $G_{i/o}$ proteiinien kautta negatiivisesti adenyylaattisyklaasiin ja positiivisesti mitogeneeniaktivoituun proteiinikinaasiin. CB1- ja CB2-reseptorit ovat rakenteellisesti 44 prosenttisesti samankaltaisia.⁴ CB1-reseptoreita sijaitsee runsaasti pikkuaivoissa, mustatumakkeessa, hippokampuksessa, aivokuorukassa, linssitumakkeen pallossa ja lateraalissa aivojuovion osissa.⁵⁻⁸ CB2-reseptoreita esiintyy immuunisoluissa, esimerkiksi lymfosyyteissä, makrofageissa, syöttösoluissa, luonnollisissa tappajasoluissa ja mikrogliaassa.⁹ CB1-reseptorit ovat osallisia monissa fysiologisissa ja patologisissa toiminnoissa, kuten aivojen kehitys, tajunta, muisti ja ruokahalu.^{10,11} CB1-reseptori liittyy myös neuropsykiatriin sairauksiin ja aivojen rappeumaan, kuten skitsofreniaan ja Alzheimerin tautiin.^{12,13}

1.1.1. Kannabinoidireseptorien toiminta

G-proteiinikytkettyjen reseptorien ligandit voidaan jakaa neljään kategoriaan niiden vuorovaikutuksen perusteella. Agonisti sitoutuu reseptoriin ja saa aikaan vasteen ja konformaation muutoksen. Antagonisti ei saa aikaan vastetta ja samalla estää agonistia sitoutumasta. Osittainen agonisti ei saa aikaan täyttä vastetta, mistä johtuen konformaation muutos ei ole täydellinen. Osittainen agonisti estää agonistin sitoutumisen, koska sitoutumiskohta on miehitetty ja agonistin aikaansaamaa täydellistä vastetta ei pääse syntymään. Käänteisagonisti sitoutuu kohdereseptoriin, mutta saa aikaan vastakkaisen vasteen, kuin agonisti. Ligandin toimintatapa ei vaikuta sen ja reseptorin väliseen affiniteettiin.²

$G_{i/o}$ -tyyppin G-proteiinien välityksellä tapahtuva CB1- ja CB2-reseptoreiden aktivaatio voi johtaa useisiin solunsisäisiin tapahtumiin, jotka ovat usein solutyypin- ja agonistispesifisiä. CB1- ja CB2-reseptoreiden aktivaatio voi johtaa jänniteportillisten kalsium kanavien inhibitioon ja CB1-reseptorien tapauksessa myös kalium kanavien

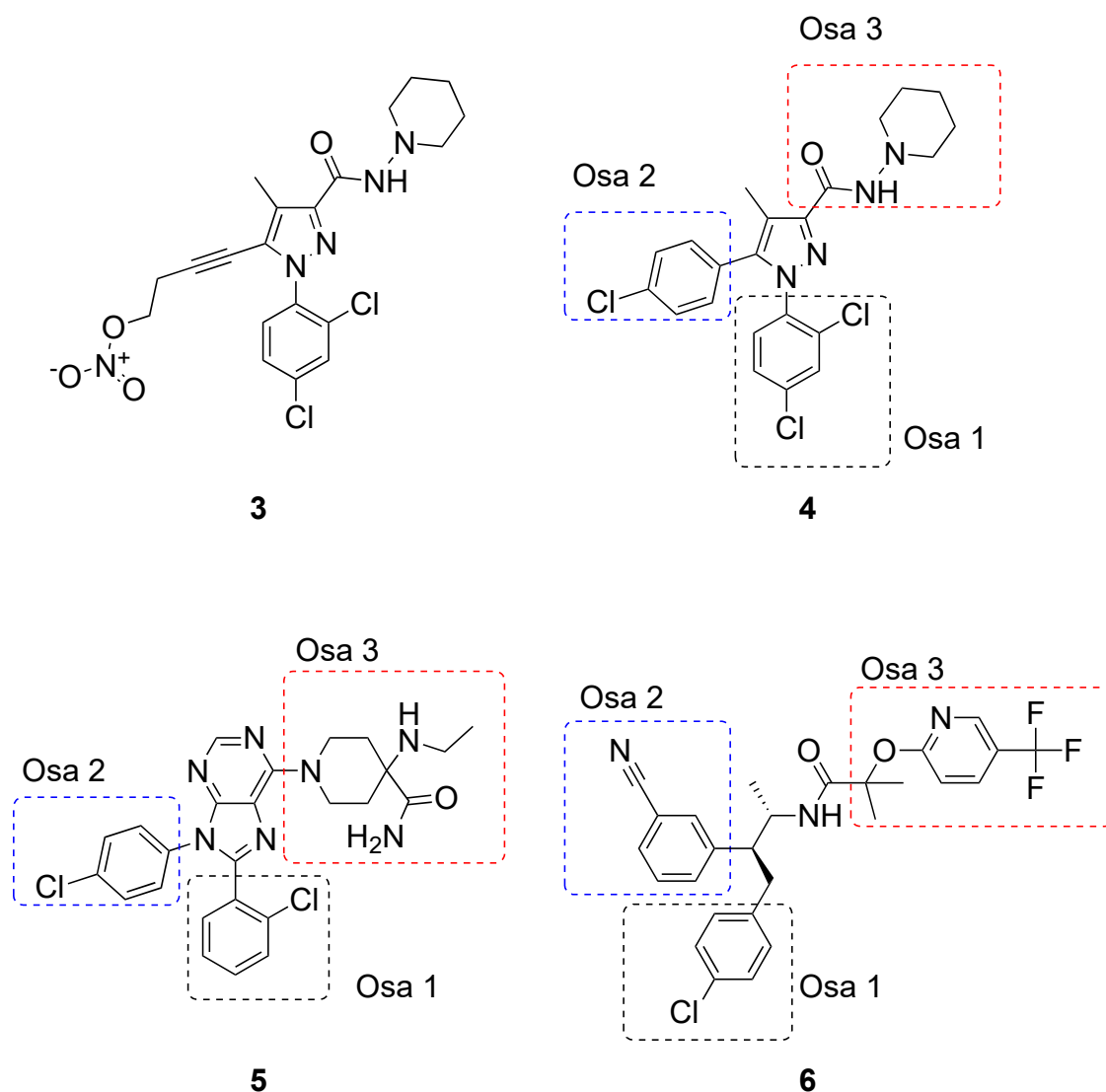
aktivaatioon. Adenylaattisykloasientsyymiin aktivaatio tapahtuu G-proteiinien välityksellä. Ensyymiin inhibitio johtaa alhaisempaan syklisen adenosinimonofosfaatin (cAMP) pitoisuuteen, mikä toimii soluissa toisiolähttinä.¹⁴ Elimistössä esiintyy kahta endogeenistä kannabinoidiagonistia CB1- ja CB2-reseptoreille. Anandamidia (AEA, **1**) ja 2-arakidonyyliglyserolia (2-AG, **2**) valmistetaan postsynaptisissa membraaneissa.¹⁵ Runsaasti CB1-reseptoreita sisältävissä GABAergisissä ja glutamergisissä presynapseissa CB1-reseptoreihin sitoutuvat AEA ja 2-AG inhiboivat aivojen välittäjäaineiden, kuten gamma-aminovoihapon (GABA) ja glutamaatin vapautumista.^{16,17} Hydrolyyttisten entsyymien lisäksi anandamidi metaboloituu rasvahappoamidihydrolaasin (FAAH) seurauksena ja 2-arakidonyyliglyseroli monoasyyloglyserolilipaasin (MAGL) seurauksena.¹⁸⁻²⁰ Spesifiset kannabinoidireseptorin vuorovaikutusproteiinit CRIP1a ja CRIP1b liittyvät myös kannabinoidireseptorien toimintaan. Niiden uskotaan säätelevän solunsisäistä kulkeutumista, vaimennussäätelyä, signaalien välitystä ja perusluonteista CB1-reseptorien aktiivisuutta.²¹



Kuva 1. Anandamidin (**1**) ja 2-arakidonyyliglyserolin (**2**) rakenteet.

Hua et al.²² ovat tutkineet CB1-reseptorin rakennetta ja sitoutumista. He tutkivat CB1-reseptoria AM6538 (**3**) antagonistin avulla, joka pohjautuu rimonabanttiin (**4**). AM6538 stabiloi ligandin ja CB1-reseptorin kompleksia edistään CB1-kiderakennetta. Kompleksin avulla saatiin selville monimutkainen sitoutumistaskujen verkosto, joka koostuu reseptorin eri alueille ulottuvista kanavista ja toissijaisista sitoutumistaskuista. Kolmeosainen ligandirakenne on tyypillinen CB1-reseptorien antagonistilla ja käänteisillä antagonistilla ja sen uskotaan olevan tärkeä reseptorin signaloimattoman konformaation joustavuuden kannalta (kuva 2). Rimonabantin, otenabantin (**5**) ja taranabantin (**6**) rooli sitoutumisessa pystyttiin kuvailemaan yhdistämällä CB1-

reseptorin 3D-rakenne ja antagonistien molekulaarinen sitoutuminen. Rakenteen ensimmäinen osa on tärkeä korkean sitoutumisen affiniteetin kannalta ja sijaitsee reseptorin antagonisti-sitoutumisalueella. Rakenteen toinen osa ulottuu hydrofobisella sitoutumisalueella sijaitsevaan pitkään kanavaan. Rakenteen kolmas, aromaattinen tai alifaattinen osa painaa membraanin läpäisyalueella heliksejä I ja II. Tämä johtaa heliksien taipumiseen ulospäin ja mahdollisesti muuttaa reseptorin farmakologista signaalitilaa. Rakenteen kolmannen osan kookas rengasrakenne todennäköisesti vaikuttaa CB1 antagonismiin. Rakenteen kolmannessa osassa on mahdollista käyttää erilaisia kemiallisia ryhmiä ja rakenteen toisessa osassa fenyylirenkaan *para*-asemaan pystytään kiinnittämään esimerkiksi pitkä hiiliketju.²²



Kuva 2. AM6538 (3), rimonabantin (4), otenabantin (5) ja taranabantin rakenteet (6).²²

1.2. Positroniemissiotomografia

Positroniemissiotomografia (PET) on ei-invasiivinen ja erittäin herkkä menetelmä, jolla voidaan saada tietoa erilaisista biologisista ja farmakologisista prosesseista.²³ PET-merkkiaineita käyttämällä pystytään saamaan kvantitatiivista tietoa esimerkiksi tietyn merkkiaineen reseptoreiden miehitystasosta. Positroniemissiotomografiassa hyödynnetään β^+ -hajoamisen kautta puoliintuvia radionuklideita. β^+ -hajoamisessa atomin ytimeistä emittoituu positroni, joka vuorovaikuttaa väliaineen kanssa ja menettää energiansa ionisoituaan sitä. Positronin kulkemaan matkaan vaikuttaa sen energia. Positroni annihiloituu elektronin kanssa pysähtyttyään, jolloin syntyy kaksi 511 keV gammakvanttia, jotka lähtevät vastakkaisiin suuntiin. Energia vastaa positronin ja elektronin lepomassaa. Kuvattavan kohteen ympärillä olevat detektorit havaitsevat useiden annihilaatioiden seurauksen syntyneet gammakvantit, jolloin PET-kameraan liitetty laitteisto pystyy paikantamaan annihilaatioiden tapahtumapaikat ja muodostamaan PET-kuvan.²⁴

1.3. PET-merkkiaineet

Merkkiaineilla on useita vaatimuksia, jotta kuvantamisella saadaan aikaiseksi laadukkaita PET-kuvia. Merkkiaineiden selektiivisyys ja sitoutumisen affiniteetin kohteena olevaan reseptoriin tulee olla korkea, mutta mikäli reseptoreita on runsaasti, vaatimus korkeasta affiniteetista ei ole niin kriittinen.²⁵ Affiniteettia kuvata eri tavoin. *In vitro* -tehokkuutta kuvataan K_b -arvolla, kilpailevaa inhibitiota kuvataan K_i -arvolla ja IC_{50} -arvo kuvaa konsentraatiota, jolla kilpaileva inhibiittori tuottaa 50 % inhibition.²⁶

Aivojen reseptorien kuvantamiseen tarkoitettujen merkkiaineiden tulee läpäistä veri-aivoeste. Reseptorien kuvantaminen on tällöin tehokasta ja samalla minimoidaan muun kehon ja elinten saama annos. Aivoesteen läpäisyyn vaikuttaa merkkiainemolekyylin lipofiilisyys, molekyylipaino ja vetysidosten muodostaminen. Molekyylipainon rajana pidetään 400–600 Daltonia. Vetysidosten muodostaminen tulisi olla mahdollisimman vähäistä.²⁷ Liian alhainen lipofiilisyys heikentää veri-aivoesteen läpäisyä ja voi johtaa heikkoon sekä viivästyneeseen kulkeutumiseen aivoihin. Liian korkea lipofiilisyys voi myös haitata veri-aivoesteen läpäisyä, koska merkkiaine pysyy sitoutuneena lipidimembraaneihin tai veren proteiineihin.²⁸ Lipofiilisuuden ollessa optimaalinen, epäspesifiset sitoutumiset minimoituvat ja merkkiainemolekyylit kulkeutuu pois alueilta missä ei ole kohteena olevia reseptoreita. Maksan metabolian seurauksena syntyvien merkkiainemetaboliittien tulisi läpäistä veri-aivoeste heikosti verrattuna alkuperäiseen

merkkiainemolekyyliin, jotta eri alueiden kuvantaminen ei vääristyisi väärin signaalien takia. Lipofiilisyyden ilmoittamiseen käytetään useita eri termejä kuten $\log P$ ja $\log D$. Lipofiilisyyden määrittämiseen erottelemalla yhdiste oktanolin ja puskurin välillä. Yhdisteen logaritmiset konsentraation suhteet oktanolikerroksessa jaetaen puskurikerroksessa olevilla, jolloin saadaan $\log P$.²⁹ Fysiologisessa pH:ssa tehdyssä mittauksessa käytetään alaindeksinä arvoa 7.4.³⁰ $\log D$ -arvo ottaa määrittämisessä huomioon kaikki liukoisuuteen vaikuttavat tekijät. Lipofiilisyyden ajatellaan olevan optimaalinen veri-aivoesteeseen läpäisyyn ja ei toivottujen sitoutumisten välttämiseen, kun $\log P$ arvo on välillä 2,0–3,5.²⁹

Endogeenisillä CB1 -reseptoreiden ligandeilla on kohtalainen affiniteetti ja ne ovat lipofiilisiä, minkä vuoksi ne soveltuvat heikosti PET-merkkiaineiden kehityksen kohteeksi. Lipofiilisyyttä optimoimalla on kehitetty merkkiaineita, joiden affiniteetti on pystytty pitämään korkeana.

Metabolian seurauksena syntyvät merkkiainemetaboliitit ja radioleimat aiheuttavat vääristymää kuvantamistuloksiin. On tärkeää, ettei merkkiaine metaboloitu liian nopeasti elimistössä. Uusia merkkiaineita kehitettäessä yhdisteen rakenteeseen ja radioleiman sijaintiin on kiinnitettävä huomiota.

Molaarinen aktiivisuus (A_m) tarkoittaa radioaktiivisuuden suhdetta ainemäärään (Bq/mol). Fluori-18:n teoreettinen maksimi on $A_m = 63 \text{ TBq}/\mu\text{mol}$ ja hiili-11:n $A_m = 341 \text{ TBq}/\mu\text{mol}$. Laboratorio-olosuhteissa saavutettujen molaaristen aktiivisuuksien maksimit jäävät huomattavasti teoreettisia arvoja alhaisemmiksi, fluori-18:n $A_m = 1 \text{ TBq}/\mu\text{mol}$ ja hiili-11:n $A_m = 5 \text{ TBq}/\mu\text{mol}$.³¹ Korkea molaarinen aktiivisuus on tärkeää, kuvannettaessa reseptoreita, joiden esiintymien tiheys on alhainen. Mikäli molaarinen aktiivisuus on alhainen, ei-radioaktiivinen yhdiste saattaa miehittää reseptoreita ja radioaktiivinen merkkiaine ei pääse sitoutumaan reseptoreihin, mikä voi heikentää kvantitatiivista analyysiä ja PET-kuvien kvalitatiivista tulkintaa.^{31,32} Korkea molaarinen aktiivisuus on erityisen tärkeää käytettäessä bioaktiivisia ja toksisia merkkiaineita, jolloin liian suuri määrä ei-radioaktiivista yhdistettä saattaa aiheuttaa farmakologisia tai toksisia vaikutuksia. Molaarista aktiivisuutta heikentää radionuklidin sekoittuminen stabiilin nuklidin kanssa. Stabiilin nuklidin kontaminaatioita voi aiheutua radionuklidin tuotantoprosessissa, siirtolinjoista ja synteesiä tehdessä reagensseista ja hiili-11:sta kohdalla ilmasta.^{31,33} Molaarista aktiivisuutta on mahdollista kasvattaa rajallisesti säteilytysaika pidentämällä sekä säteilytysvirtaa kasvattamalla.³¹

Kannabinoidimerkkiaineissa radionuklidina käytetään yleensä hiili-11:tä ja fluori-18:aa niiden ominaisuuksien takia. Molemmat emittoivat hajotessaan positroneita (β^+), joiden annihilaatio elektronien kanssa saa aikaan kaksi 511 keV gammakvanttia, jotka

voidaan havaita PET-kameralla. Hiili-11 hajoaa β^+ -hajoamisen kautta 99,8 prosenttisesti ja elektronikaappauksella (EC) 0,2 prosenttisesti. Vastaavat lukemat fluori-18:lla ovat 96,7 % β^+ -hajoamisella ja 3,3 % EC:lla. Fluori-18:n etuna on sen pidempi puoliintumisaika ($T_{1/2} = 109,8$ min) verrattuna hiili-11:n puoliintumisaikaan ($T_{1/2} = 20,4$ min). Pidempi puoliintumisaika mahdollistaa monimutkaisempien synteisien ja puhdistuksien tekemisen. Pidempi puoliintumisaika mahdollistaa myös merkkiaineen kuljettamisen muualla sijaitsevaan kuvantamisaikkaan. Fluori-18:lla on alhainen positronin maksimienergia ($E_{\max} = 634$ keV) verrattuna hiili-11:n ($E_{\max} = 960$ keV). Positronin maksimienergia vaikuttaa positronin kulkemaan matkaan väliaineessa, joten alhainen E_{\max} mahdollistaa hyvän paikkaresoluution PET-kuvantamisessa. Nestemäisen fluori-18:sta käsittely on helpompaa verrattuna $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$, joten fluori-18 valmistetaan usein syklotronilla ydinreaktiolla $^{18}\text{O}(p,n)^{18}\text{F}$ säteilyttämällä kohtiössä olevaa happi-18 rikastettua vettä. Hiili-11 tuotetaan yleensä syklotronilla ydinreaktiolla $^{14}\text{N}(p,\alpha)^{11}\text{C}$, jolloin saadaan joko $[^{11}\text{C}]\text{CH}_4$ tai $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$, riippuen kohtiokaasusta. ^{11}C voidaan käyttää orgaanisten yhdisteiden leimaamiseen. Se on käytännöllinen, koska se ei vaikuta farmakokinetiikkaan tai sitoutumisprofiileihin. Fluorilla voidaan korvata molekyyllissä esimerkiksi vety tai hydroksyyli-ryhmä, millä voi olla yhdisteen stabiilisuutta kasvattava vaikutus suhteessa metaboliaan. Fluori voi vaikuttaa yhdisteen kykyyn kulkeutua membraanin läpi laskemalla molekyylin emäksisyyttä. Lisäksi fluori voi lisätä yhdisteen sitoutumisen affiniteettia.³⁴

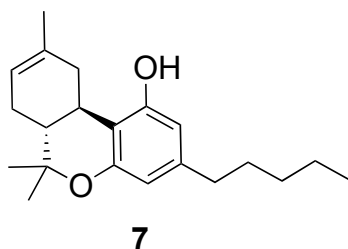
Taulukko 1. Radionuklidien ominaisuuksia.³⁵

Radionuklidi	Puoliintumisaika [min]	Hajoaminen [%]	Positronin maksimienergia [keV]	Positronin maksimimatka vedessä [mm]	A_m teoreettinen maksimi [TBq/umol]
^{11}C	20,4	β^+ (99,8) EC (0,2)	960	4,2	341
^{18}F	109,8	β^+ (96,7) EC (3,3)	634	2,4	63

1.4. PET-kannabinoidimerkkiaineet

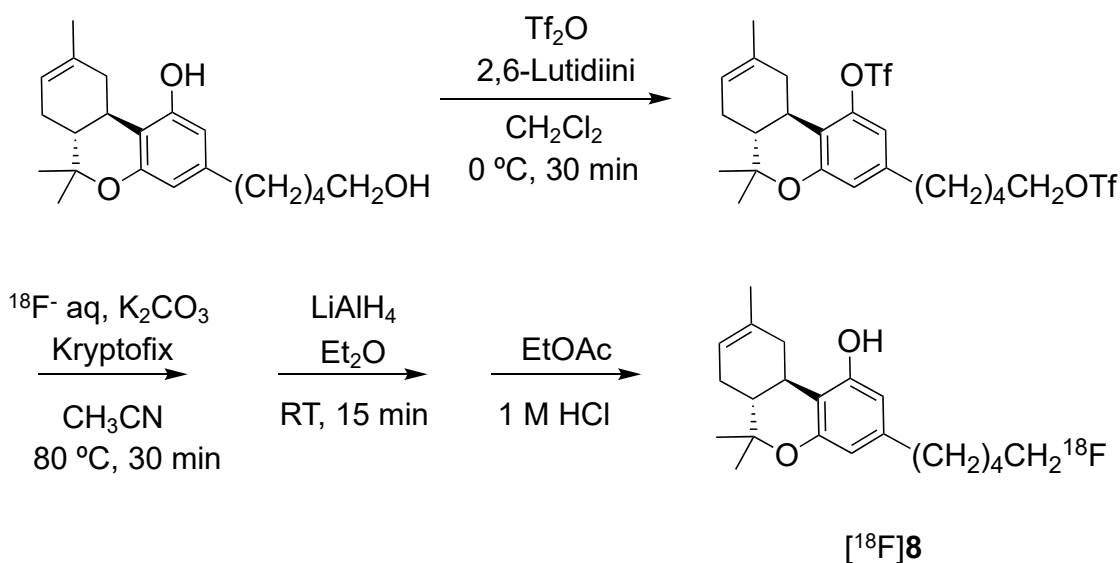
1.4.1. (-)-5'-[¹⁸F]- Δ^8 -THC

Δ^9 -Tetrahydrokannabinolin (Δ^9 -THC, **7**) on kannabiksen psykoaktiivinen ainesosa, joka sitoutuu CB1-reseptoreihin. Δ^9 -THC:n löysivät Gaoni ja Mechoulam vuonna 1964.³⁶ Δ^9 -THC ei sovellu CB1-reseptorien PET-kuvantamiseen yhdisteen ominaisuuksien, kuten erittäin korkean lipofiilisyyden ja keskinkertaisen affiniteetin takia.



Kuva 3. Δ^9 -Tetrahydrokannabinolin (**7**) rakenne.

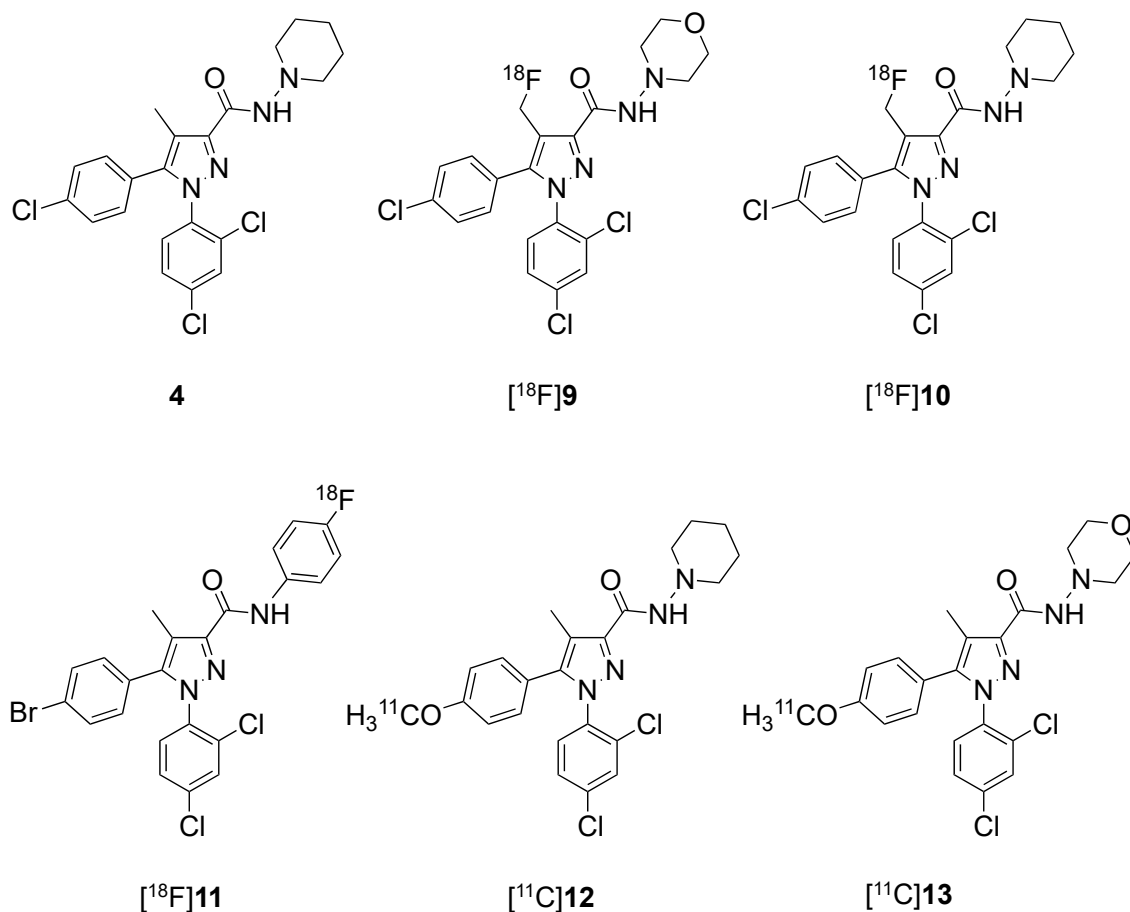
Charalambous et al.³⁷ valmistivat ensimmäisen Δ^9 -THC:in pohjautuvan CB1-reseptorien merkkiaineen (-)-5'-[¹⁸F]- Δ^8 -THC ([¹⁸F]**8**), missä ¹⁸F-radioleima sijaitsee hiilivetyketjun päässä. Nukleofiilinen fluorinaatio tehtiin (-)-5'-OH- Δ^8 -THC:n ditriflaattille käyttäen [¹⁸F]FK/Kryptofixia. Suojaus poistettiin litiumalumiinihydridillä. PET-tutkimukset suoritettiin paviaaneilla ja hiirillä. [¹⁸F]**8** kulkeutui huonosti aivoihin ja distribuutio aivoissa oli tasainen. Kulkeutuminen kalloon viittasi radioleiman irtoamiseen merkkiainemolekyylistä.³⁷



Kuva 4. (-)-5'-[¹⁸F]- Δ^8 -THC:n ([¹⁸F]**8**) synteesi.

1.4.2. Rimonabanttiin pohjautuvia merkkiaineita

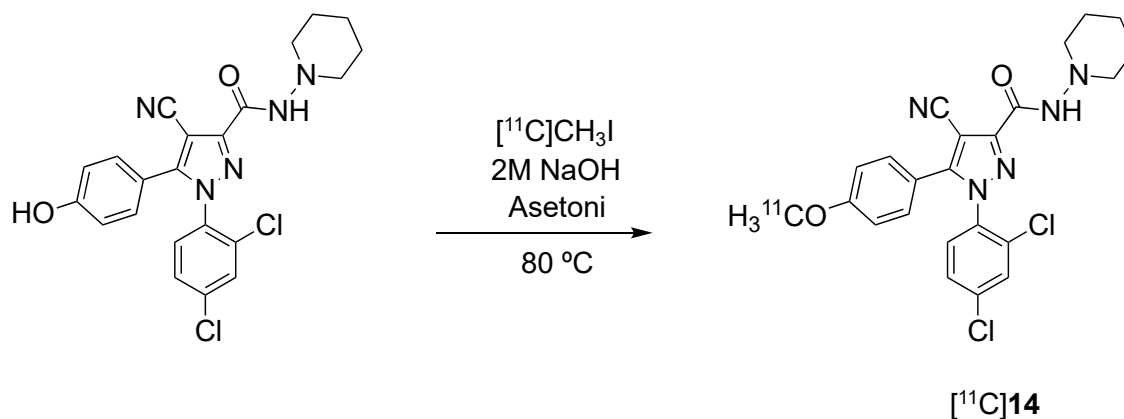
Rimonabanti, 5-(4-kloorifenylyli)-1-(2,4-dikloorifenylyli)-4-metyyli-*N*-(piperidin-1-yyli)-1*H*-pyratsoli-3-karboksamidi (SR141716A, **4**) on selektiivinen CB1R-antagonisti.³⁸ Se kiihdyttää rasva- ja sokeriaineenvaihduntaa ja siitä suunniteltiin lihavuuslääkettä, kunnes rimonabanti yhdistettiin vakaviin haittavaikutuksiin.³⁹ Rimonabantista on kehitetty useita sitä muistuttavia radioligandeja, joita on leimattu sekä fluori-18:sta että hiili-11:sta. [¹⁸F]SR147963 ([¹⁸F]**9**), [¹⁸F]SR144385 ([¹⁸F]**10**), [¹⁸F]AM5144 ([¹⁸F]**11**), [¹¹C]SR149080 ([¹¹C]**12**) ja [¹¹C]SR149568 ([¹¹C]**13**) soveltuvat kuitenkin huonosti kuvantamistarkoitukseen. Merkkiaineet ovat joko liian lipofiilisiä ja epäspezifisiä tai läpäisevät veri-aivoesteen heikosti.^{40–43}



Kuva 5. SR141716A (**4**), [¹⁸F]SR147963 ([¹⁸F]**9**), [¹⁸F]SR144385 ([¹⁸F]**10**), [¹⁸F]AM5144 ([¹⁸F]**11**), [¹¹C]SR149080 ([¹¹C]**12**) ja [¹¹C]SR149568 ([¹¹C]**13**) rakenteet.

1-(2,4)-dikloorifenylyli)-4-syano-5-(4-[¹¹C]metoksifenylyli)-*N*-(piperidin-1-yyli)-1*H*-pyratsoli-3-karboksamidin ([¹¹C]JHU75528/[¹¹C]OMAR, [¹¹C]**14**) on valmistettu radiometylaatiolla käyttäen [¹¹C]metyylijodidia (kuva 6). Synteesin kokonaisaika HPLC-puhdistuksen ja formuloinnin kanssa oli noin 28 minuuttia.⁴⁴ Lopputuotteen

radiokemiallinen puhtaus oli yli 99 % ja puoliintumisaikakorjaamattomat radiokemialliset saannot noin 15 %.^{44,45} Molaariset aktiivisuudet olivat 235 ± 108 GBq/ μ mol ($n = 11$).⁴⁴



Kuva 6. [¹¹C]14 synteesi.

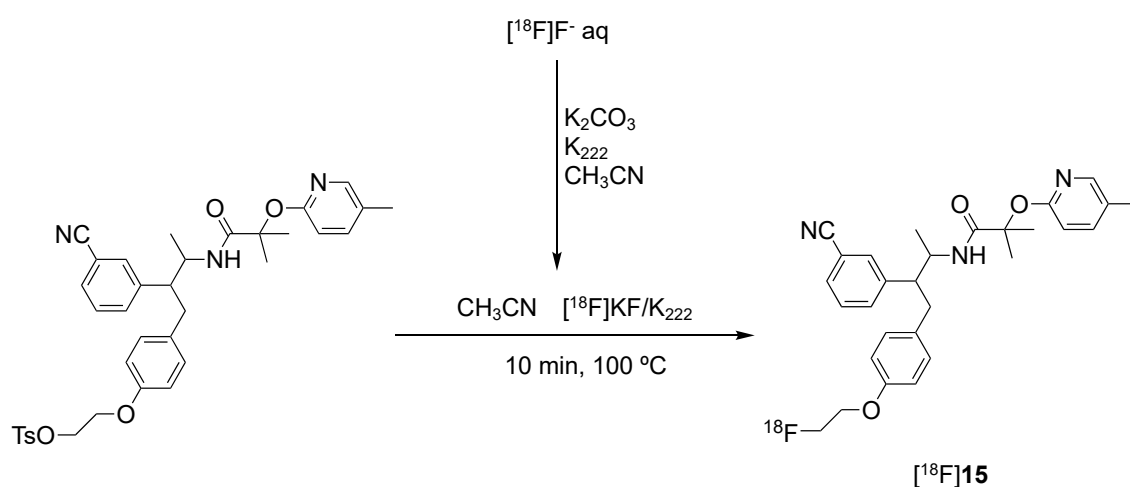
[¹¹C]14 syntetisoinnissa on onnistuttu parantamaan yhdisteen affiniteettia ($K_i = 11$ nM), spesifisyyttä ja laskemaan lipofiilisyyttä ($\log D_{7.4} = 3,6$) verrattuna aikaisempiin antagonisteihin. Eläinkokeet paviaaneilla ja hiirillä osoittivat, että merkkiaine kulkeutuu aivoihin ja sillä pystytään kuvantamaan CB1-reseptoreita.^{44–46} Wong et al.^{47,48} tutkivat [¹¹C]14 merkkiaineella CB1-reseptoreita skitsofreniaa sairastavilla potilailla ja terveillä kontroleilla. Tutkimukset osoittivat kohonneen CB1-reseptorien saatavuuden, mikä voi johtua CB1-reseptorien kasvaneesta tiheydestä.^{47,48}

1.4.3. [¹⁸F]MK-9470

Burns et al.⁴⁹ kehitti vuonna 2007 taranabanttiin pohjautuvan merkkiaineen *N*-[2-(3-syanofenyyl)-3-(4-(2-[¹⁸F]fluorietoksi)fenyyli)-1-metyylipropyli)-2-(5-metyyli-2-pyridiloksi)-2-metyylipropaaninamidi ([¹⁸F]MK-9470, [¹⁸F]15). [¹⁸F]15 on selektiivinen käänteisagonisti ja sillä on korkea CB1R-affiniteetti.⁴⁹ Merkkiaineella on tutkittu radioligandin sitoutumista CB1-reseptoreihin ikääntyvillä ihmisillä ja tutkittu mahdollista sukupuolesta riippuvaista vaikutusta. Miesten ja naisten välillä havaittiin eroavaisuuksia radioligandin sitoutumisessa eri aivojen alueille. CB1R-sitoutuminen lisääntyy iän myötä etenkin limbisessä järjestelmässä, motorisilla ja muistin alueilla.⁵⁰ [¹⁸F]MK-9470 merkkiaineella on tutkittu myös pitkäaikaisen kannabiksen polttamisen vaikutuksia. Merkkiaineen avulla on pystytty vahvistamaan, että pitkäaikainen

kannabiksen käyttö johtaa tietyillä aivojen alueilla CB1-reseptoreiden vaimennussäätelyyn.⁵¹

[¹⁸F]**15** on onnistuttu valmistamaan automatisoidulla GMP-tuotantoon soveltuvalla synteesillä (kuva 7). [¹⁸F]Fluoridin aktivointi on suoritettu atseotrooppista tislausta käyttäen. Puoliintumisaikakorjatut radiokemialliset saannot ovat olleet $30,3 \pm 11,7 \%$ ($n = 12$) radiokemiallisen puhtauden ollessa $97,5 \pm 1,2 \%$ ($n = 12$). Saavutetut molaariset aktiivisuudet ovat olleet $373,7 \pm 151,7 \text{ GBq}/\mu\text{mol}$ ($n = 12$). [¹⁸F]**15** on valmistettu myös käyttämällä [¹⁸F]fluoribromietaanä kaksivaiheisessa synteesissä, mutta nukleofiilisellä [¹⁸F]fluorinaatiolla on saavutettu kuusinkertainen saanto.⁵²



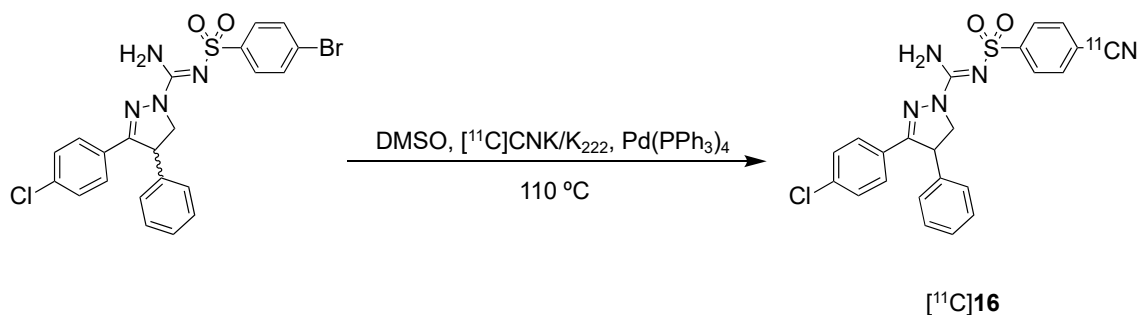
Kuva 7. [¹⁸F]**15** synteesi.

1.4.4. [¹¹C]SD5024

Donohue et al.⁵³ syntetisoivat selektiivisen CB1R-antagonistin (–)-3-(4-kloorifenyyl)-*N'*-[(4-syanofenyyl)sulfonyyli]-4-fenyyl-4,5-divety-1*H*-pyratsoli-1-karboksidiimidini ([¹¹C]SD5024, [¹¹C](–)**16**). [¹¹C](–)**16** sitoutuu CB1-reseptoreihin korkealla affiniteetillä ($K_i = 0,5 \text{ nM}$), mutta sen enantiomeerin affiniteetti osoittautui alhaisemmaksi ($K_i = 16,9 \text{ nM}$).⁵³

Donohue et al. suorittivat radioleimauksen käyttämällä [¹¹C]syanidi-onia, joka valmistettiin syklotronilla valmistetusta [¹¹C]metaanista (kuva 8). Radioleimaukseen käytettiin bromatun lähtöaineen raseemista seosta. Tuote puhdistettiin käänteisfaasi-HPLC:n avulla ja formuloitiin haihdutuksen jälkeen. Puoliintumisaikakorjattu radiokemiallinen saanto oli 36 % ($n = 2$). Radiokemiallinen puhtaus oli yli 98 prosenttia ja molaarinen aktiivisuus $\geq 56 \text{ GBq}/\mu\text{mol}$. Kokonaissynteesiaika oli noin 30 minuuttia. Merkkiaineen arvioinnit suoritettiin apinoilla ja suurimmat kertymäärät (SUV) mitattiin

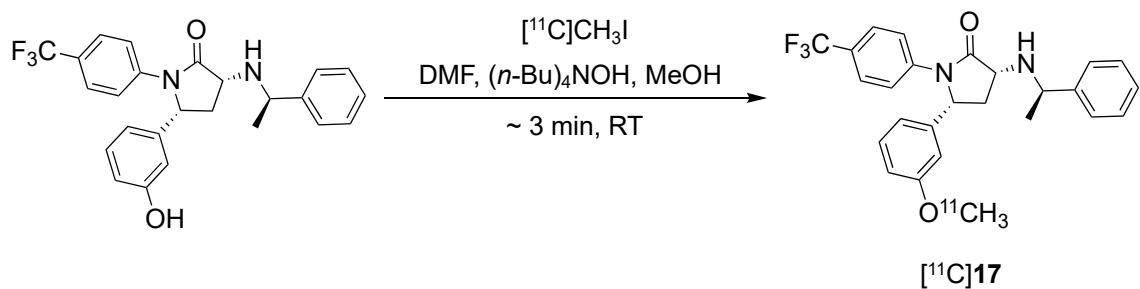
aivojuovioissa 48 minuuttia injektion jälkeen. Kertyminen muualle aivoihin noudatti CB1-reseptorien esiintymien tiheyttä eri alueilla.⁵³ [¹¹C]**16** on osoittautunut lupaavaksi hiili-11 leimatuksi CB1R-merkkiaineeksi ihmiskuvantamiseen.⁵⁴



Kuva 8. [¹¹C]**16** synteesi.

1.4.5. [¹¹C]MePPEP

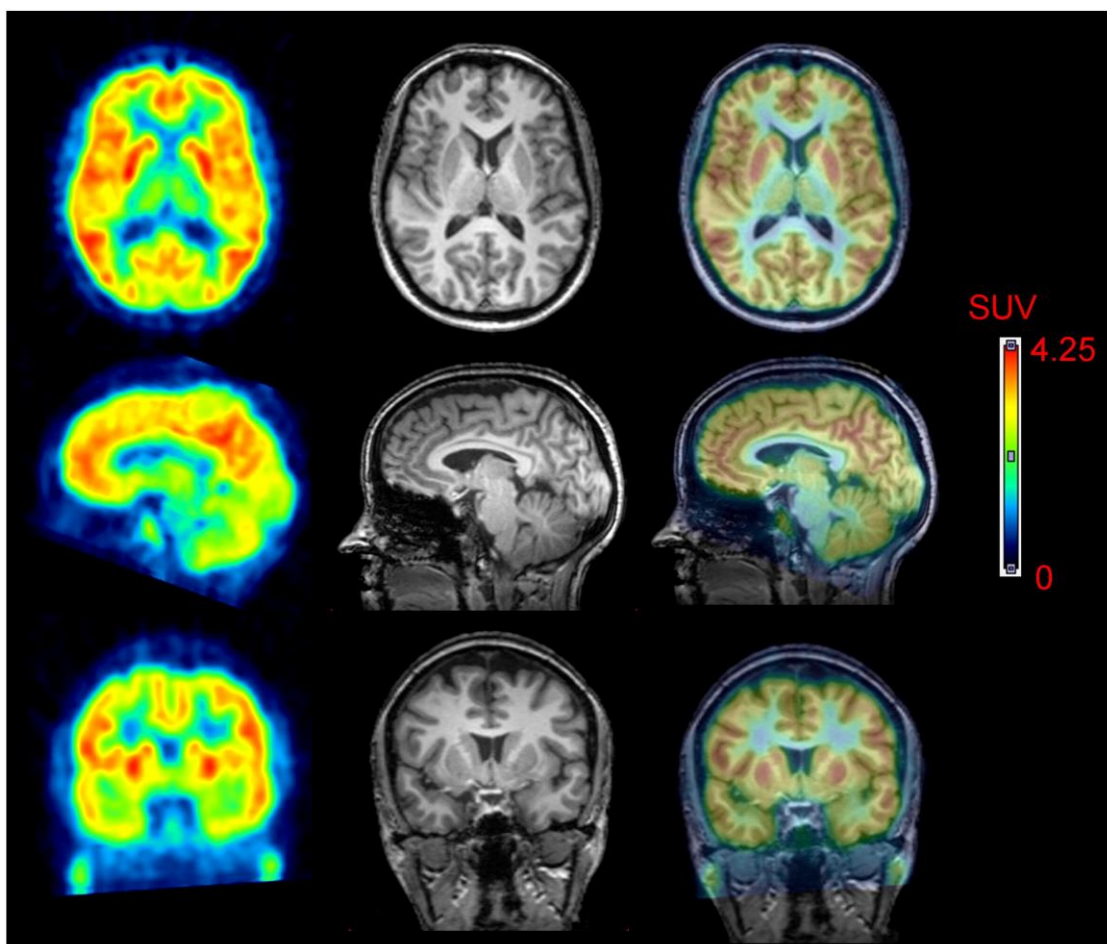
Yasuno et al.⁵⁵ syntetisoivat hiili-11:sta radioleimatus CB1R-merkkiaineen (3*R*,5*R*)-5-(3-metoksifenyyli)-3-[(*R*)-1-fenyylietyyliammino]-1-(4-trifluorimetyylifenyyli)-pyrrolidini-2-oni ([¹¹C]MEPPEP, [¹¹C]**17**). Merkkiaineella on korkea CB1R-affiniteetti ($K_b = 0,57$ nM) ja se on kohtalaisen lipofiilinen ($\log D_{7.4} = 4,8$).⁵⁵ [¹¹C]SD5024 lipofiilisyys ($\log D_{7.4} = 3,8$) on kuitenkin optimaalisempi verrattuna [¹¹C]**17**.⁵⁴ Yasuno et al.⁵⁵ sekä Donohue et al.⁵⁶ ovat valmistaneet [¹¹C]**17** merkkiainetta kaupallisilla synteesilaitteilla käyttäen [¹¹C]metyylijodidia (kuva 9). [¹¹C]CH₃I valmistettiin syklotronilla valmistetusta [¹¹C]hiilidioksidista pelkistämällä [¹¹]CO₂ ensin [¹¹C]metaaniksi ja sitten halogenoimalla [¹¹C]metyylijodidiksi.⁵⁶ Reaktio suoritettiin kaupallisen synteesilaitteen metallisessa silmukassa, johon dimetyylformamidiin liuotettu lähtöaine oli laitettu odottamaan [¹¹C]CH₃I:n virtausta metanoliin liuotetun *n*-tetrabutyyliammoniumhydroksidin kanssa.^{55,56} Käänteisfaasi-HPLC ja tuotteen formulaatio mukaan luettuna kokonaissynteesiaika oli noin 40 minuuttia. Puoliintumisaikakorjattu radiokemiallinen saanto oli $2,5 \pm 1,1$ % ($n = 57$). Molaarinen aktiivisuus oli $> 78,1$ GBq/ μ mol ja radiokemiallinen puhtaus > 95 %. Saavutetut aktiivisuudet ja puhtaudet olivat riittävät eläin- tai ihmiskuvantamiseen.⁵⁶



Kuva 9. [¹¹C]17 synteesi.

[¹¹C]17 merkkiaineen soveltuvuutta kuvantamistarkoituksiin on tutkittu eläinkokeissa apinoilla. Kertymät aivoihin olivat linjassa CB1R-esiintymien kanssa ja [¹¹C]17 reversiibeli sitoutuminen CB1-reseptoreihin pystyttiin osoittamaan. Merkkiaineen sitoutumista CB1-reseptoreihin havaittiin suurissa määrin aivojuovioissa ja pikkuaivoissa ja vähemmän talamuksessa ja aivosillassa. Kertymähuiput (SUV) mitattiin pikkuaivoissa 10–20 minuuttia injektion jälkeen. [¹¹C]17 kertymähuiput osoittautuivat kuusi kertaa suuremmiksi verrattuna merkkiaineeseen [¹¹C]JHU75528.⁵⁵

Terry et al.⁵⁷ selvittivät [¹¹C]MePPEP soveltuvuutta CB1R-kvantitointiin ihmisillä. Kertymä aivoihin oli korkea ja poistuma hidasta. Kertymä oli huipussa 60 minuuttia injektion jälkeen neocortexin alueilla. Aivokuorukassa havaittiin suurempi kertymä, mikä selittyy tiheillä CB1R-esiintymillä (kuva 10). [¹¹C]17 kertyi aivoihin paremmin, kuin [¹⁸F]MK-9470 ja [¹¹C]JHU75528. [¹¹C]17 ei aiheuttanut farmakologisia vaikutuksia.⁵⁷



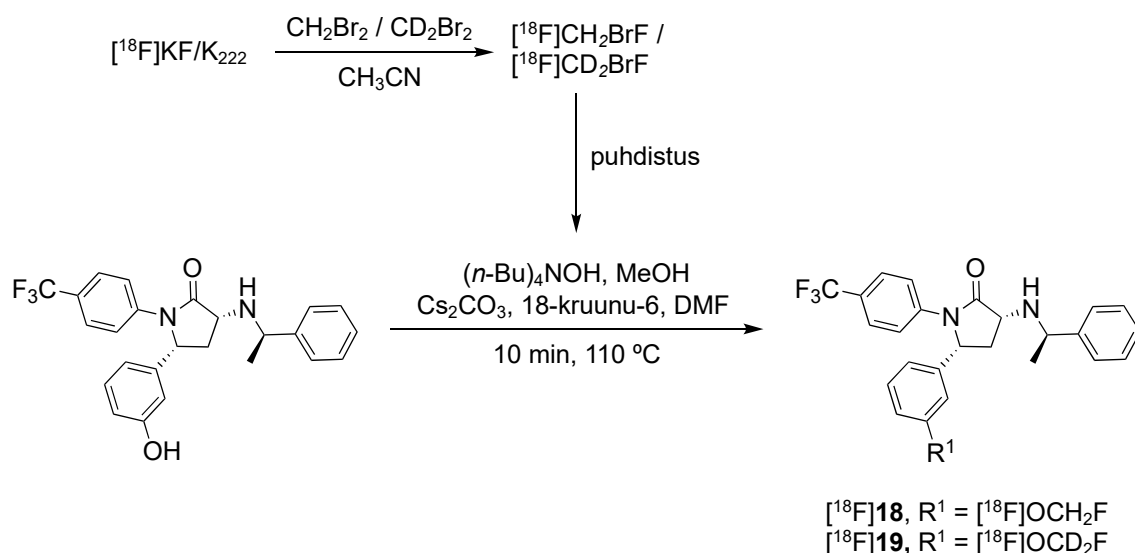
Kuva 10. Vasemmalla ihmisen aivot kuvattuna positroniemissiotomografialla 40–80 minuuttia injektiosta. Käytetty merkkiaine $[^{11}\text{C}]\text{MePPEP}$. Keskellä magneettikuva. Oikealla PET- ja magneettikuva päällekkäin. Kuva julkaistu oikeuksien haltijan luvalla.⁵⁷

1.4.6. $[^{18}\text{F}]\text{FMPEP}$, $[^{18}\text{F}]\text{FMPEP-}d_2$

(3*R*,5*R*)-5-(3-Fluorimetoksifenyyli)-3-[(*R*)-1-fenyylietyyliamino]-1-(4-trifluorimetyyli-fenyyli)-pyrrolidiini-2-oni ($[^{18}\text{F}]\text{FMPEP}$, $[^{18}\text{F}]\mathbf{18}$) ja (3*R*,5*R*)-5-[(3-fluorimetoksi- d_2)fenyyli]-3-[(*R*)-1-fenyylietyyliamino]-1-(4-trifluorimetyylifenyyli)-pyrrolidiini-2-oni ($[^{18}\text{F}]\text{FMPEP-}d_2$, $[^{18}\text{F}]\mathbf{19}$) ovat keskenään hyvin samanlaisia. Donohue et al.⁵⁶ syntetisoivat vuonna 2008 nämä CB1R-spesifit merkkiaineet. $[^{18}\text{F}]\mathbf{18}$ lipofiilisyyden on kohtalaisen korkea ($\log D_{7.4} = 5,7$) ja sen *in vitro* -tehokkuus on suuri ($K_b = 0,18 \text{ nM}$).⁵⁶

Radioleimaukset suoritettiin muokatulla kaupallisella synteesilaitteella. $[^{18}\text{F}]\text{fluoridi}$ (aq) valmistettiin syklotronilla ja aktivoitiin atseotrooppisella tislauksella. Donohue et al.⁵⁶ valmistivat radioleimausreaktiossa käytettävän $[^{18}\text{F}]\text{fluorimetyylibromidin}$ nukleofiilisella ^{18}F -fluorausreaktiolla dibromimetaanista ja $[^{18}\text{F}]\text{FK}/\text{K}_{222}$ -kompleksista asetonitriilissä. $[^{18}\text{F}]\text{fluorimetyylibromidin}$ puhdistus dibromimetaanista suoritettiin sarjaan kytkettyjen silikageelipatruunoiden avulla. Dibromimetaani voi toimia kilpailevana leimausreaktiossa, mikäli sitä ei sitä ei poisteta. Puhdistus on mahdollista

tehdä myös kaasukromatografian avulla. Leimausreaktio tehtiin emäksisissä olosuhteissa dimetyyliformamidissa (kuva 10). Kokonaissynteesiaika HPLC-puhdistus ja formulointi mukaan luettuna oli noin 120 minuuttia. $[^{18}\text{F}]\mathbf{18}$ radiokemiallinen saanto oli $5,9 \pm 1,3 \%$ ($n = 3$) ja molaarinen aktiivisuus synteesin loppuhetkellä $> 57 \text{ GBq}/\mu\text{mol}$. $[^{18}\text{F}]\mathbf{19}$ radiokemiallinen saanto oli $7,9 \pm 2,4 \%$ ($n = 6$) ja molaarinen aktiivisuus synteesin loppuhetkellä $> 68 \text{ GBq}/\mu\text{mol}$. Molempien radiokemiallinen puhtaus oli yli 95 %.⁵⁶

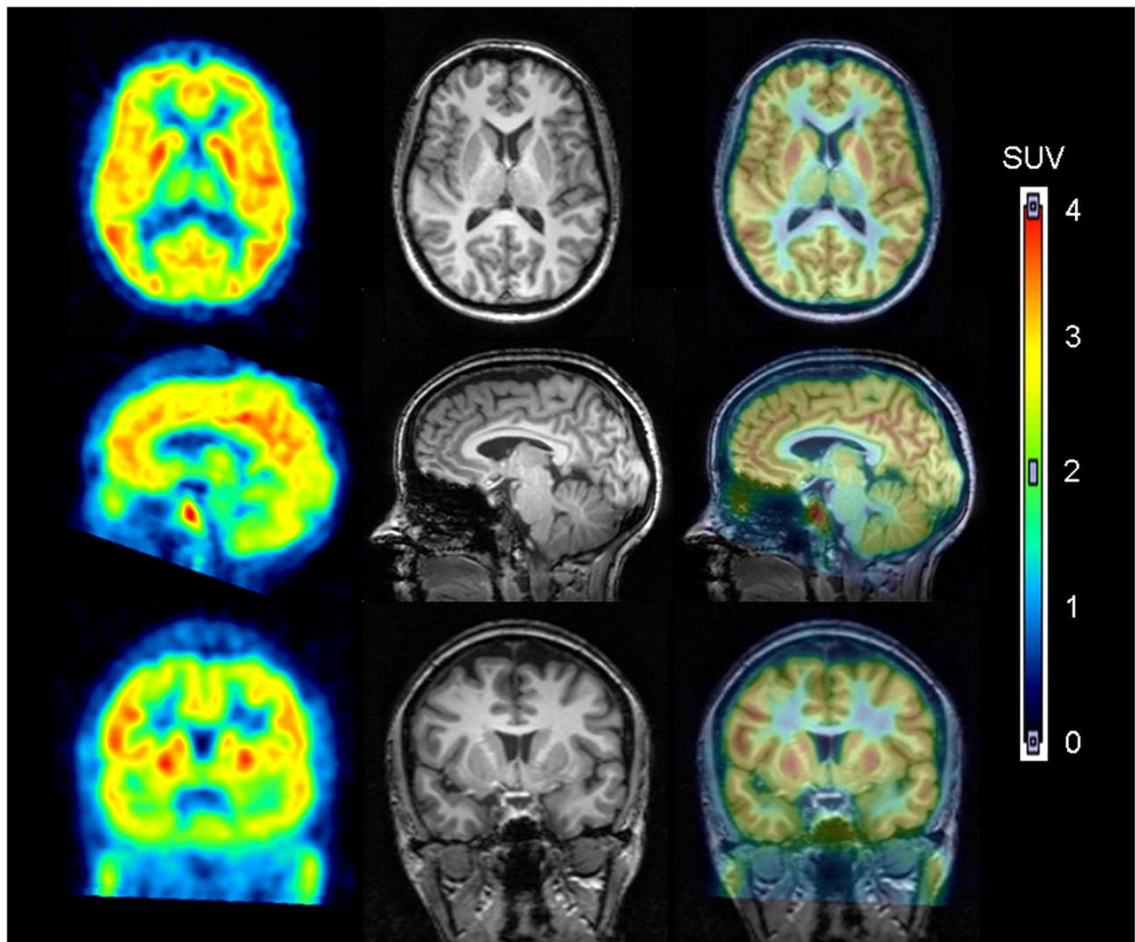


Kuva 11. $[^{18}\text{F}]\mathbf{18}$ ja $[^{18}\text{F}]\mathbf{19}$ synteesit.

Terry et al.⁵⁸ tutkivat merkkiaineiden $[^{18}\text{F}]\mathbf{18}$ ja $[^{18}\text{F}]\mathbf{19}$ soveltuvuutta eläimillä ja ihmisillä. $[^{18}\text{F}]\mathbf{19}$ kertyi paremmin apinoiden aivoihin ja kertymähuippu mitattiin molemmilla merkkiaineilla 20 minuuttia injektion jälkeen. Suurimmat kertymät havaittiin molemmilla merkkiaineilla pikkuaivoissa ja aivosillassa. Spesifistä sitoutumista CB1-reseptoreihin tutkittiin estämällä merkkiaineen sitoutuminen rimonabantin avulla. Spesifinen sitoutuminen oli 80–90 %. $[^{18}\text{F}]\mathbf{19}$ valittiin tutkimuksiin ihmisillä, koska sen kertymä luuhun oli noin kolmasosan pienempi verrattuna $[^{18}\text{F}]\mathbf{18}$ kertymään.⁵⁸

Ihmisillä tehdyt tutkimukset osoittivat merkkiaineen kerääntyvän alueille, missä sijaitsee CB1-reseptoreita (kuva 12). Kertymähuippu aivoissa saavutettiin noin 30 minuuttia injektion jälkeen. Suurimmat kertymät havaittiin aivokuorukassa ja neocortixin alueella. Aktiivisuuden määrä väheni hitaasti aivoissa ja noin 85 % huippuarvosta oli jäljellä kaksi tuntia injektion jälkeen. Kertymä oli vähäistä valkeassa aineessa ja aivosillassa, toisin kuin apinoilla suoritetuissa tutkimuksissa. Aktiivisuutta kertyi huomattavasti kalloon ja kallonpohjaan (clivus) erityisesti 120–300 min välillä,

mikä viittasi merkkiaineen [^{18}F]19 defluorinaatioon ja [^{18}F]fluoridin kertymiseen luuhun. [^{18}F]Fluoridi voi irrota [^{18}F]fluorimetoksiryhmästä metabolian seurauksena ja aiheuttaa vääristymää kuvantamistuloksiin, minkä vuoksi kuvantamisaika tulisi olla alle 120 minuuttia [^{18}F]19 merkkiaineella.⁵⁸ Defluorinaatiota voidaan ehkäistä korvaamalla [^{18}F]fluorimetoksiryhmästä vetyjä deuteriumilla. Hiilen ja deuteriumin välinen sidos on voimakkaampi verrattuna hiilen ja vedyn väliseen sidokseen ja kyseisen sidoksen katkeamisen arvellaan olevan defluorinaatioon johtava välivaihe.^{58,59} [^{18}F]19 kertymä aivoihin oli samankaltaista kuin [^{11}C]MePPEP-merkkiaineella, mutta [^{18}F]19 saavuttaa huippuarvot nopeammin ja sen poistuma on nopeampaa. [^{18}F]19 tarkkuus on myös parempi verrattuna [^{11}C]MePPEP-merkkiaineeseen.⁵⁸



Kuva 12. Vasemmalla ihmisen aivot kuvattuna positroniemissiotomografialla 30–60 minuuttia injektiosta. Käytetty merkkiaine [^{18}F]FMPEP- d_2 . Keskellä magneettikuva. Oikealla PET- ja magneettikuva päällekkäin. Kuva julkaistu oikeuksien haltijan luvalla.⁵⁸

[^{18}F]FMPEP- d_2 -merkkiainetta on käytetty tutkimustarkoituksessa eläimillä ja ihmisillä. Takkinen et al.⁶⁰ tutkivat CBIR-muutoksia Alzheimerin taudin mallihiirillä.

Tutkimukset osoittivat [¹⁸F]**19** soveltuvan CB1-reseptorien saatavuuden tutkimiseen Alzheimerin taudin yhteydessä.⁶⁰ Hirvonen et al.⁶¹ osoittivat [¹⁸F]**19** avulla pitkäaikaisen kannabiksen polttamisen johtavaan reversiibeliin CB1-reseptorien vaimennussäätelyyn.⁶¹ Borgan et al.⁶² tutkivat CB1-reseptoreiden saatavuuden tasoja ensipsykoosissa. CB1-reseptoreiden saatavuus oli laskenut antipsykoottisesti hoidetuilla ja hoitamattomilla kohorteilla. Matala CB1-reseptorien saatavuus korreloi vakavien oireiden ja heikon kognitiivisen toimintakyvyn kanssa.⁶² Lahesmaa et al.⁶³ ovat tutkineet CB1-reseptorien ilmentymää ihmisen ruskeassa rasvakudoksessa.⁶³

Lahdenpohja et al.⁶⁴ julkaisivat vuonna 2020 kokemuksia pitkäaikaisesta [¹⁸F]FMPEP-*d*₂:n GMP-tasoisesta tuotannosta. Synteesireitti on samankaltainen Donohue et al.⁵⁶ julkaiseman synteesireitin kanssa. Synteesit on tehty itse rakennetulla synteesilaitteistolla. [¹⁸F]Fluorimetyyli-bromidin puhdistus on suoritettu kaasukromatografian avulla ja reaktioaikana on ollut 5 minuuttia. 234 synteesin perusteella kokonaissynteesiaika oli 83 ± 7 min semipreparatiivinen HPLC-puhdistus ja formulointi mukaan luettuna. Puoliintumisaikakorjattu radiokemiallinen saanto oli 16 ± 6 % ja molaarinen aktiivisuus 600 ± 300 GBq/μmol. Radiokemiallinen puhtaus oli yli 95 % kaikissa kliiniseen käyttöön vapautetuissa erissä. [¹⁸F]**19** lipofiilisyyden ja radiolyysi korkean radioaktiivisuuskonsentraation omaavassa formuloidussa tuotteessa olivat aiheuttaneet vastoinkäymisiä. Radiolyysiä pystyttiin vähentämään askorbiinihapon avulla.⁶⁴

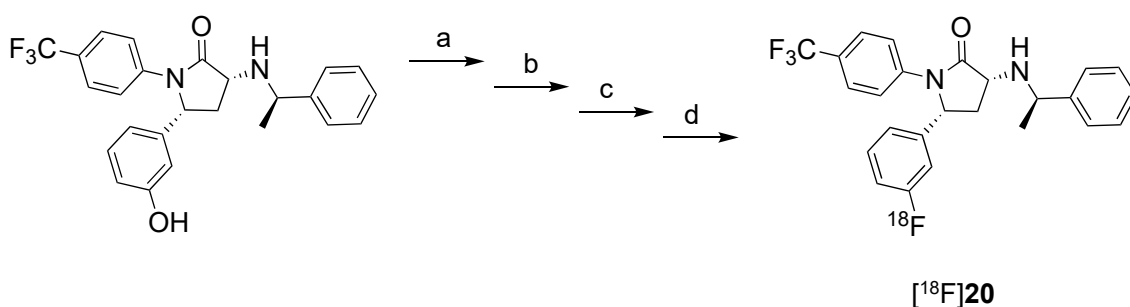
1.4.7. [¹⁸F]FPATPP

Lahdenpohja et al.⁶⁵ syntetisoivat [¹⁸F]FMPEP-*d*₂ muistuttavan CB1R-spesifin merkkiaineen (3*R*,5*R*)-5-(3-[¹⁸F]fluorifenyyli)-3-[(*R*)-1-fenyylietyyliamino]-1-(4-trifluori-metyyli-fenyyli)pyrrolidiini-2-oni ([¹⁸F]FPATPP, [¹⁸F]**20**). Merkkiaineen [¹⁸F]**19** *in vivo* -stabiilisuutta pyrittiin parantamaan kiinnittämällä [¹⁸F]fluori suoraan rengasrakenteeseen.⁶⁵

Synteesissä käytettiin ruteniumvälitteistä radioleimausta ja tutkittiin [¹⁸F]fluoridin (aq) aktivointimenetelmien vaikutusta radiokemialliseen saantoon. Lähtöaine liuotettiin (syklopentadieeni)Ru(COD)Cl-kompleksin kanssa etanoliin ja lämmityksen jälkeen reaktioseokseen lisättiin asetonitriiliin liuotettu 1,3-*bis*(2,6-diisopropyyli-fenyyli)imidatsoliumkloridi. Reaktioseos käytettiin puhdistamattomana radioleimauksissa. Reaktio-olosuhteiden optimoinnissa verrattiin eri lämpötiloja, jotka olivat 100–130 °C ja 160 °C. Atseotrooppisen tislauksen reaktioissa käytettiin ainoastaan

160 °C lämpötilaa. Reaktioajat olivat 10, 20, ja 30 minuuttia. 100 °C reaktiolämpötilaa käyttämällä ei havaittu tuotetta. Reaktiolämpötilaa nostamalla 160 °C:seen saavutettiin kaksinkertainen radiokemiallinen saanto verrattuna 130 °C reaktiolämpötilaan. Reaktio tapahtui nopeammin, kun [¹⁸F]fluoridin aktivointiin käytettiin atseotrooppista tislauksa. 10 minuutin reaktion jälkeen havaittiin kaksinkertainen raakatuotteen radiokemiallinen saanto, verrattuna kiinteäfaasiuuton (SPE) reaktioihin. Atseotrooppisen tislauksen yhteydessä käytettävä kaliumkarbonaatti paransi kiinteäfaasiuuton yhteydessä raakatuotteen radiokemiallista saantoa noin 30 prosenttia 30 minuutin reaktiossa.⁶⁵

Prekliinistä arviointia varten tuotettu merkkiaine [¹⁸F]**20** valmistettiin 30 minuutin reaktioajalla 160 °C lämpötilassa hyödyntäen kiinteäfaasiuuttoa (kuva 11). Kokonaissynteesiaika oli 87 ± 5 min (n = 5). Saavutettu puoliintumisaikakorjattu radiokemiallinen saanto oli 16,7 ± 5,7 % (EOB, n = 5) ja molaarinen aktiivisuus > 95 GBq/μmol (EOS, n = 1).⁶⁵ Radiokemiallinen puhtaus oli 99,9 ± 0,1 % (n = 5), mikä on parempi verrattuna merkkiaineen [¹⁸F]**19** pitkäaikaisessa valmistuksessa havaittuun radiokemialliseen puhtauteen.^{64,65} Eluutiotehokkuus ioninvaihtopatruunasta oli 93 ± 2 % (n = 5).⁶⁵

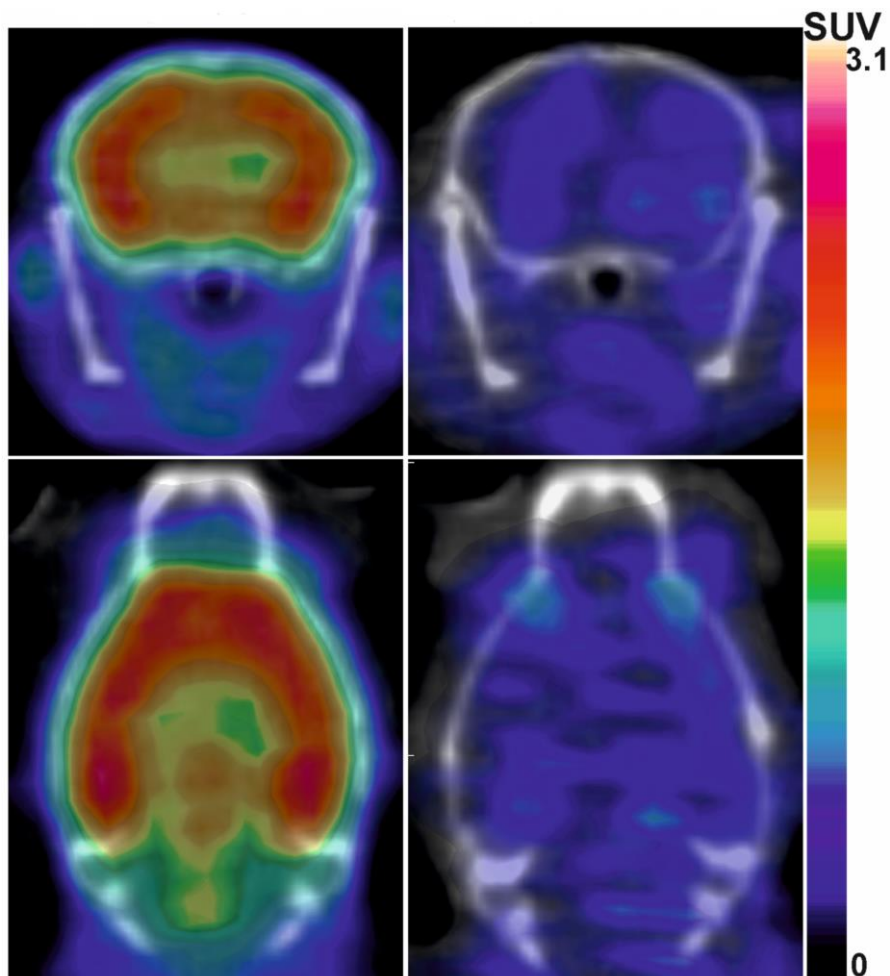


Kuva 13. [¹⁸F]**20** synteesi Ru-välitteisesti (a) CpRu(COD), EtOH, 85 °C, 30 min (b) Imid.Kloridi, CH₃CN (c) [¹⁸F]F⁻ (aq) aktivointi (d) ¹⁸F-fluoraus, CH₃CN:DMSO, 160 °C, 30 min.

Merkkiaineen [¹⁸F]**20** stabiilisuus osoittautui hyväksi, koska merkittävää merkkiaineen hajoamista ei havaittu 5 h synteesin loppuhetkestä (n = 2). Formuloidun merkkiaineen [¹⁸F]**20** käyttöajan arvioitiin olevan ainakin 300 minuuttia, minkä aikana ei synny merkittäviä radioaktiivisia epäpuhtauksia.⁶⁵ [¹⁸F]**20** etuna on stabiilisuus suhteessa radiolyysiin ja defluorinaatioon, mikä mahdollistaa lähes kolme kertaa pidemmän käyttöajan verrattuna [¹⁸F]**19** merkkiaineeseen.^{58,64,65}

[¹⁸F]FPATPP:n soveltuvuutta arvioitiin *in vivo* ja *ex vivo* -tutkimuksissa hiirillä. Kertymähuippu havaittiin 30 minuuttia injektion jälkeen, mikä vastaa merkkiaineen

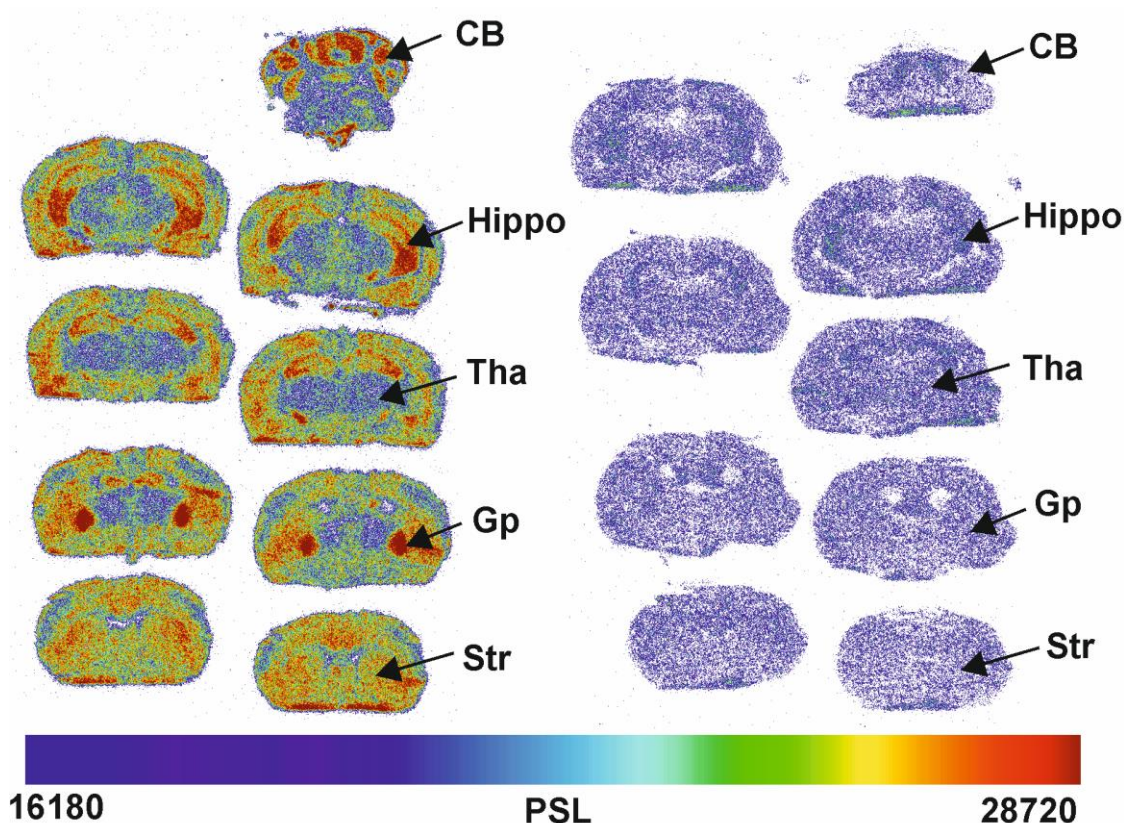
[¹⁸F]19 kertymähuippua.^{60,65} Suurimmat kertymät havaittiin neocortexin alueella ja hippokampuksessa.⁶⁵ Poistuma alkoi heti kertymähuipun saavuttamisen jälkeen toisin kuin [¹⁸F]19 samankaltaisissa tutkimuksissa.^{60,65} Spesifistä sitoutumista tutkittiin rimonabantin avulla. Rimonabanti sitoutui CB1-reseptoreihin ja esti noin 60 % [¹⁸F]20 sitoutumisesta 120 minuuttia injektion jälkeen yleisesti aivojen alueella, neocortexissa ja hippokampuksessa (kuva 14).



Kuva 14. PET/CT-kuva hiiren aivoista. Vasemmalla koronaali ja transaksiaali PET/CT-kuva 90–120 minuuttia injektiosta. Käytetty merkkiaine [¹⁸F]FPATPP. Oikealla kuvattava hiiri esikäsitelty rimonabantilla 2 mg/kg. Kuva julkaistu oikeuksien haltijan luvalla.⁶⁵

Autoradiografialla tehdyt *ex vivo* -tutkimukset tukivat tietoa spesifistä sitoutumisesta. 120 minuuttia injektion jälkeen havaittiin sitoutumista alueilla, missä on paljon CB1-reseptoreita kuten aivojuoviossa, linssitumakkeen pallossa, hippokampuksessa, aivokuoressa ja pikkuaivojen harmaassa aineessa. Lisäksi hippokampuksen ja aivokuoren kerrokset erottuivat selvästi (kuva 15). *Ex vivo* -tutkimukset osoittivat myös [¹⁸F]19 defluorinaation olevan kuusinkertainen verrattuna [¹⁸F]20 merkkiaineeseen. Tiedon

perusteella voidaan olettaa [^{18}F]20 olevan stabiilimpi suhteessa defluorinaatioon, koska ^{18}F on kiinni suoraan aromaattisessa rengasrakenteessa eikä [^{18}F]fluorimetoksihännässä. [^{18}F]FPATPP osoittautui lupaavaksi merkkiaineeksi korkean kertymän ja spesifisen sitoutumisensa ansiosta. Matala defluorinaatio ja nopea poistuminen tukevat myös tulkintaa. Haasteena [^{18}F]20 merkkiaineen synteessissä on korkea ruteniumin pitoisuus lopputuotteessa $7,8 \pm 1,8 \mu\text{g/ml}$.⁶⁵ Ruteniumin suurin sallittu parenteraalinen altistuminen on $10,8 \mu\text{g/päivä}$, joten ennen kliinistä käyttöä ruteniumin määrää lopputuotteessa tulisi vähentää.⁶⁶



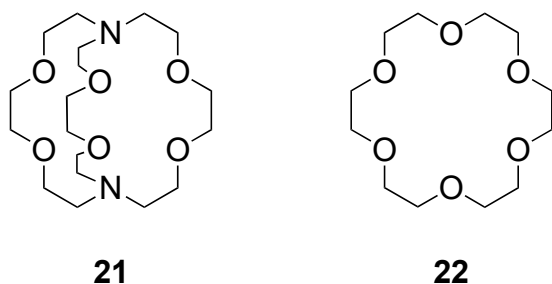
Kuva 15. Hiiren aivojen *ex vivo* autoradiografiakuvat 120 minuuttia injektion jälkeen. Käytetty merkkiaine [^{18}F]FPATPP. Oikealla kuvattava hiiri esikäsitelty rimonabantilla 2 mg/kg. Kuva julkaistu oikeuksien haltijan luvalla.⁶⁵

1.5. Leimausstrategiat

^{18}F -fluorausreaktioita ovat joko nukleofiilisiä tai elektrofiilisiä reaktioita. Elektrofiiliseen ^{18}F -fluorauksessa käytetään [^{18}F]F₂-kaasua, joka reagoi elektronirikkaiden alkeenien tai aromaattisten rakenteiden kanssa additio tai substituution kautta. Haasteena elektrofiilisessä ^{18}F -fluorauksessa on [^{18}F]F₂:n reaktiivisuus ja kantajakaasusta johtuva alhainen molaarinen aktiivisuus lopputuotteessa. Reaktiivisuutta on hillitty kehittämällä [^{18}F]F₂:sta johdettuja sekundaarisia leimausreagensseja, kuten [^{18}F]Selectfluor

bis(triflaatti).⁶⁷ Nukleofiiliseen ¹⁸F-fluoraukseen käytetään usein [¹⁸F]fluoridia. Nukleofiilinen substituutio on reaktio, missä nukleofiili korvaa molekyyllisessä lähtevän ryhmän. Alifaattisten yhdisteiden ¹⁸F-fluoraukseen käytetään S_N2-mekanismia ja lähtöaineessa lähtevänä ryhmänä on tyypillisesti jodi, bromi, tosylaatit, mesylaatti tai triflaatti.²⁷ Areenien ¹⁸F-fluoraukseen käytetään S_NAr-mekanismia. Lähtevänä ryhmänä on usein nitroryhmä, trimetyyliammoniumsuola tai halogeeni, kuten fluori, bromi, kloori tai jodi. Nukleofiilisen aromaattisen substituution onnistumiseksi aromaattisessa renkaassa tulee usein olla elektroneja puoleensavetävä ryhmä *orto*- tai *para*-asemassa suhteessa lähtevään ryhmään.⁶⁸

[¹⁸F]fluoridi on solvatoituneena vesiliuoksessa ¹⁸O(p,n)¹⁸F ydinreaktion jälkeen ja on huono nukleofiili vetyionien kanssa tapahtuvan vuorovaikutuksen seurauksena. [¹⁸F]fluoridi aktivoidaan poistamalla vesi atseotrooppisen tislauksen tai kiinteäfaasiuuton avulla. Atseotrooppisessa tislauksessa [¹⁸F]fluoridi (aq) kiinnitetään usein ioninvaihtopatruunaan ja eluoidaan alkalimetallia, kuten kaliumkarbonaattia hyödyntäen. Muita käytettyjä alkalimetalleja ovat cesium ja rubidium. [¹⁸F]fluoridin liukoisuuden parantamiseen eluaatissa käytetään faasinvaihtokatalyyttejä, kuten Kryptofix 2.2.2 (**21**) ja 18-kruunu-6 eetteri (**22**) ja tetra-alkyyliammoniumsuoloja. Eluoinnin jälkeen vesi haihdutetaan atseotrooppisessa haihdutuksessa polaarisen aproottisen liuottimen ja kaasuvirtauksen avulla.⁶⁸ [¹⁸F]fluoridi (aq) voidaan myös lisätä astiaan atseotrooppista tislausta varten ilman ioninvaihtopatruunaa. Astian materiaaliin tulee kiinnittää huomiota, koska [¹⁸F]fluoridi saattaa jäädä kiinni astian seinämiin.⁶⁹ Vetysidosten muodostumisen ehkäisemiseksi ¹⁸F-leimausreaktio tehdään polaarissa aproottisessa liuottimessa, kuten *N,N*-dimetyyliformamidissa (DMF), dimetyylisulfoksidissa (DMSO) tai asetonitriilissä. Kiinteäfaasiuutossa [¹⁸F]fluoridin aktivointiin ei tarvita haihdutusta, jolloin synteesiaika lyhenee. [¹⁸F]fluoridi (aq) kiinnitetään ioninvaihtopatruunaan ja huuhdellaan veden poistamiseksi vedettömällä orgaanisella liuottimella. [¹⁸F]fluoridi eluoidaan patruunasta emäksen ja faasinvaihtokatalyytin avulla. Ioninvaihtopatruunan aktivointi, eluaatti ja eluution nopeus vaikuttavat [¹⁸F]fluoridin irtoamiseen patruunasta.⁷⁰

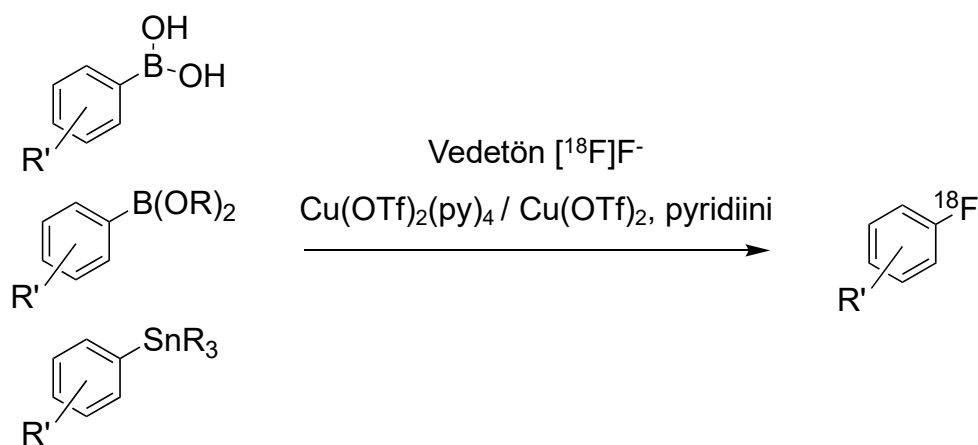


Kuva 16. Kryptofix 2.2.2:n (**21**) ja 18-kruunu-6 eetterin (**22**) rakenteet.

1.5.1. Siirtymämetallivälitteinen ^{18}F -fluoraus

Siirtymämetallivälitteistä ^{18}F -fluorausta on käytetty areenien ja heteroareenien radioleimauksiin. ^{18}F -fluorauksia on tehty onnistuneesti muun muassa palladium-, nikkeli ja ruteniumvälitteisesti.^{71–73} Palladium- ja nikkelivälitteisessä ^{18}F -fluorauksessa on kuitenkin haasteena herkkyys kosteudelle ja lähtöaineiden haastavat synteesit. Lisäksi synteesien automatisointi on vaikeaa.⁷⁰ Ruteniumkompleksit eivät ole yhtä herkkiä kosteudelle, mutta ruteniumvälitteisessä ^{18}F -fluorauksessa joudutaan käyttämään korkeita reaktiolämpötiloja.⁷¹

Kuparivälitteisellä ^{18}F -fluorauksella on mahdollista radioleimata erilaisia elektrorikkaita ja -köyhiä areeneja ja suorittaa radioleimaus synteesin myöhäisessä vaiheessa.⁷⁴ Kuparivälitteistä ^{18}F -fluorauksella voidaan radioleimata aryylistannaaneja, aryyliboorihappoja ja -estereitä.^{74–76} Tredwell et al.⁷⁴ käyttivät kuparivälitteistä ^{18}F -fluorausta pinakolijohdannaisten aryylibooriestereiden radioleimaamiseen. Aryylibooriestereiden nukleofiiliseen ^{18}F -fluoraukseen käytettiin tetrakis(pyridiini)kupari(II)triflaattia ($\text{Cu}(\text{OTf})_2(\text{py})_4$) ja $[^{18}\text{F}]\text{FK}/\text{K}_{222}$:a. Mossine et al.⁷⁶ kehittivät menetelmän aryyliboorihappojen kuparivälitteiseen ^{18}F -fluoraukseen. Synteesissä käytettiin kupari(II)triflaattia ja pyridiiniä $[^{18}\text{F}]\text{FK}$:n lisäksi. Menetelmän havaittiin olevan herkkä vahvoille emäksille kaliumkarbonaatin määrää lisättäessä.⁷⁶ Aryylibooriestereiden ja -happojen kuparivälitteiset radiofluorausmenetelmät ovat käyttökelpoisia erilaisten funktionaalisten ryhmien yhteydessä.^{74,76} Makaravage et al.⁷⁵ tutkivat aryyli- ja vinyylisannanien kuparivälitteistä nukleofiilistä ^{18}F -fluorausta käyttäen kupari(II)triflaattia, pyridiiniä ja $[^{18}\text{F}]\text{FK}$:a. Menetelmällä saavutettiin paremmat saannot lähtöaineilla, jotka oli trimetyylitinattu verrattuna tributyylylitinattuihin lähtöaineisiin. Synteesissä käytettiin dimetyyliasetamidia tai dimetyyliformamidia, koska asetonitriiliä käytettäessä ei havaittu tuotetta. Lisäksi pyridiinin määrän havaittiin vaikuttavan reaktioon.⁷⁵

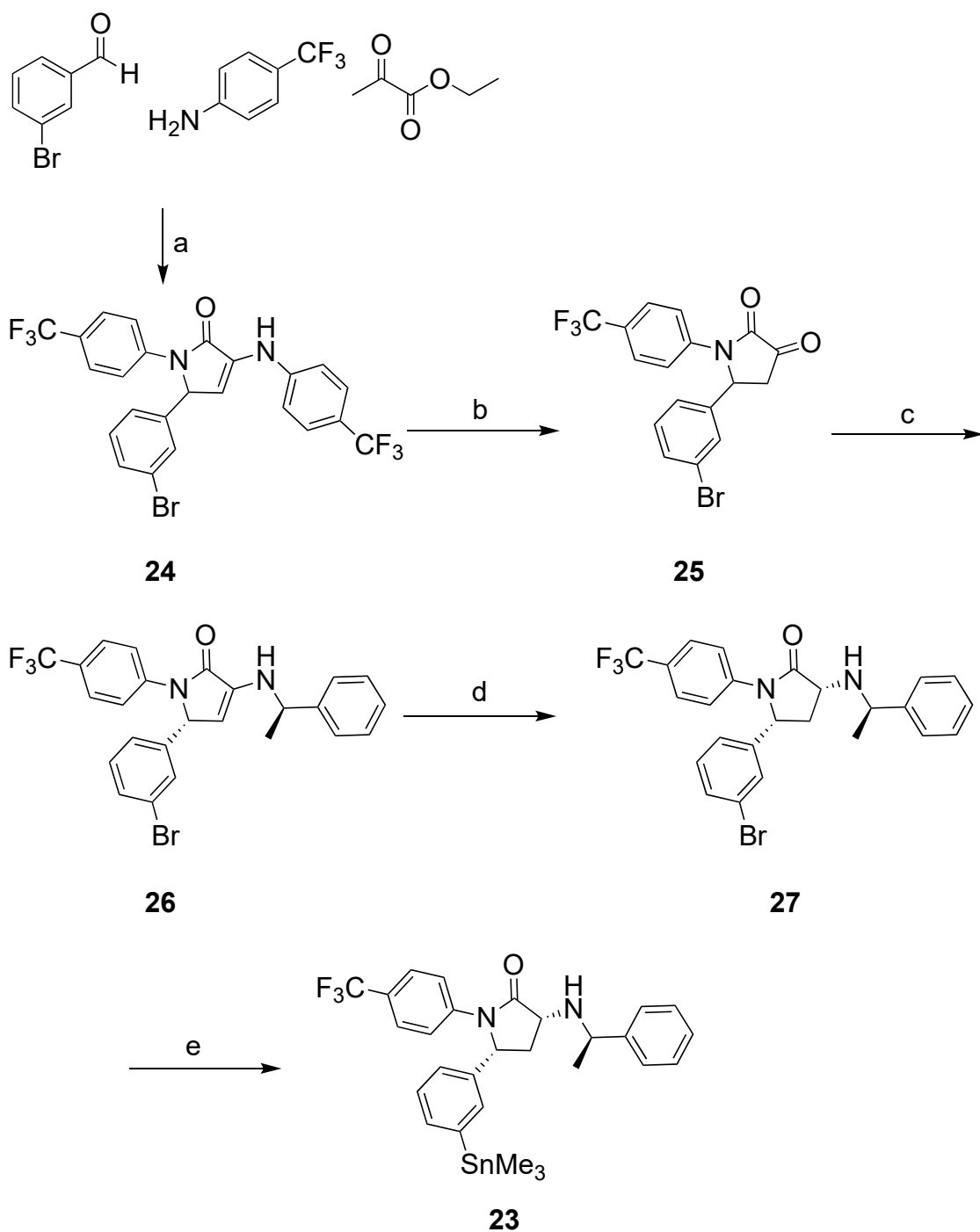


Kuva 17. Kuparivälitteinen ^{18}F -fluoraus.

Kuparivälitteisissä ^{18}F -fluorauksissa $[\text{}^{18}\text{F}]$ fluoridin aktivointiin käytetään usein atseotrooppista tislausta. Lahdenpohja et al.⁷⁰ ovat tutkineet kiinteäfaasiuuton käyttöä kuparivälitteisessä ^{18}F -fluorauksessa. Kiinteäfaasiuuttoa käyttämällä kuiva $[\text{}^{18}\text{F}]$ F⁻ on kuitenkin eluoitavissa dimetyyliasetamidiin liuotetun $\text{Cu}(\text{OTf})_2$:n tai $\text{Cu}(\text{OTf})_2(\text{py})_4$:n avulla ja käytettävissä ^{18}F -fluoraukseen ilman pitkäkestoisia välivaiheita. Ioninvaihtopatruunan aktivoinnilla havaittiin olevan vaikutusta $[\text{}^{18}\text{F}]$ fluoridin eluution tehokkuuteen. Parhaaksi menetelmäksi osoittautui 130 mg QMA-patruunan aktivointi litiumtriflaatilla (0,5 M) ja vedellä, $\text{Cu}(\text{OTf})_2$:n määrän ollessa 48 μmol .⁷⁰

1.6. Tutkimuksen tarkoitus

Tutkimuksen tarkoituksena oli valmistaa CB1-reseptoreille spesifinen radioligandi (3*R*,5*R*)-5-(3- $[\text{}^{18}\text{F}]$ fluorifenyyli)-3-[(*R*)-1-fenyylietyyli-amino]-1-(4-trifluori-metyylifenyyli)pyrrolidiini-2-oni ($[\text{}^{18}\text{F}]$ FPATPP, $[\text{}^{18}\text{F}]$ **20**). Tavoitteena oli valmistaa trimetyylitinattu lähtöaine (3*R*,5*R*)-5-(3-trimetyylitannyyliifenyyli)-3-[(*R*)-1-fenyylietyyliamino]-1-(4-trifluorimetyylifenyyli)-pyrrolidiini-2-oni (**23**) käyttäen lähtöaineina 3-bromibentsaldehydiä, 4-aminobentsotrifluoridia ja etyylipyruvaattia sekä radioleimata valmistettu lähtöaine **23** kuparivälitteisellä ^{18}F -leimauksella $[\text{}^{18}\text{F}]$ FPATPP:n valmistamiseksi. Tavoitteena oli saavuttaa radioleimauksessa korkea molaarinen aktiivisuus ja verrata kiinteäfaasiuuttoa ja atseotrooppista tislausta $[\text{}^{18}\text{F}]$ fluoridin aktivoinnissa.



Kuva 18. Lähtöaineen **23** synteesi. Reagenssit ja olosuhteet: (a) AcOH (b) 1. 37 % HCl, AcOH, huoneenlämpö 2. 60 °C (c) (*R*)-(+)-1-fenyylietyyliamiini, CH₂Cl₂ (d) NaBH₃CN, AcOH (e) (PPh₃)₂PdCl₂, Sn(Me)₆, tolueni, 120 °C.

2.2. Radioleimaus

[¹⁸F]FPATPP radioleimattiin kuparivälitteisellä ¹⁸F-leimauksella. [¹⁸F]Fluoridin (aq) aktivoinnin vaikutusta radiokemialliseen saantoon (RCY) tutkittiin käyttämällä kahta erilaista [¹⁸F]fluoridin aktivointimenetelmää, kiinteäfaasiuuttoa (SPE) ja atseotrooppista tislauksista. SPE-menetelmän reaktioissa käytettiin 100 °C, 120 °C ja 140 °C lämpötiloja ja 1, 5 ja 15 min reaktioaikoja. Atseotrooppisen tislauksen menetelmän reaktio suoritettiin 120 °C lämpötilassa 5 ja 15 min reaktioajoilla. Kokonaissynteesiaika oli noin 50 minuuttia.

SPE-menetelmässä [¹⁸F]fluoridin irrottamiseen ioninvaihtopatruunasta käytettiin dimetyyliasetamidiin (DMA) liuotettua kuparitriflaattia. Eluutiotehokkuus oli $79,8 \pm 2,9$ % (n = 8). Ioninvaihtopatruunan huuhtelun toistamisella DMA:lla ei havaittu olevan vaikutusta [¹⁸F]fluoridin irtoamiseen.

Raakatuotteiden radiokemialliset saannot (HPLC-ajoihin pohjautuvat) eri aikapisteissä on esitetty taulukossa 2. 1 min reaktioissa ei havaittu tuotetta SPE-menetelmää käytettäessä. Reaktioajan pidentämisellä 15 minuuttiin havaittiin kasvattavan radiokemiallista saantoa osassa 120 °C reaktioista. Atseotrooppista menetelmää käytettäessä RCY heikkeni huomattavasti reaktioaikaa pidennettäessä. SPE-menetelmän reaktioiden radiokemialliset saannot olivat paremmat sekä 5, että 15 minuutin reaktioajoilla.

SPE-menetelmän puhdistetun tuotteen RCY oli $5,6 \pm 0,1$ % (n = 2) ja radiokemiallinen puhtaus $88,0 \pm 4,7$ % (n = 2). Puhdistetun tuotteen aktiivisuusaanto oli 245 MBq synteesin loppuhetkellä ja molaarinen aktiivisuus 37 GBq/ μ mol. Atseotrooppisen menetelmän puhdistetun tuotteen RCY oli 1,2 % (n = 1) ja RCP vain 52,3 % (n = 1).

Taulukko 2. Raakatuotteen radiokemialliset saannot (HPLC-ajoihin pohjautuva, n = 3)

Reaktioaika [min]	Lämpötila [°C]	SPE, RCY [%]	Atseotrooppinen, RCY [%]
5	100	$8,3 \pm 3,3$	-
	120	$15,8 \pm 2,6$	14,5
	140	$17,3 \pm 3,1$	-
15	100	$7,8 \pm 2,7$	-
	120	$29,1 \pm 14,0$	2,9
	140	$12,9 \pm 2,7$	-

3. Johtopäätökset

[¹⁸F]FPATPP ([¹⁸F]**20**, (3*R*,5*R*)-5-(3-[¹⁸F]fluorifenyyli)-3-[(*R*)-1-fenyylietyyliamino]-1-(4-trifluorimetyylifenyyli)pyrrolidiini-2-oni) onnistuttiin valmistamaan lähtöaineesta **23** käyttäen molempia [¹⁸F]fluoridin aktivointimenetelmiä Cu-välitteisessä ¹⁸F-leimauksessa. Kiinteäfaasiuuttoa käyttämällä [¹⁸F]fluoridin aktivointiin saavutettiin 5 kertaa suurempi radiokemiallinen saanto. Tuotteen puhtaus ei täyttänyt merkkiaineelle asetettua radiokemiallisen puhtauden vaatimusta > 95 % ja molaarinen aktiivisuus jäi alhaiseksi. Lopputuotteen radiokemialliseen puhtauteen vaikutti [¹⁸F]fluoridin määrä, mikä havaittiin radioHPLC-analyysissä. Semipreparatiivista puhdistusta tulisi kehittää jatkossa, jotta lopputuotteen radiokemiallinen puhtaus täyttäisi sille asetetut vaatimukset. Lisäksi [¹⁸F]fluoridin määrän lopputuotteessa voisi määrittää radio-TLC määrityksellä. Lämpötilan nostaminen kasvatti raakatuotteen radiokemiallista saantoa, mutta reaktioaikaa pidennettäessä havaittiin 120 °C lämpötilan olevan optimaalisin. Jatkossa olisi kuitenkin tutkittava, oliko 120 °C, 15 minuutin reaktiossa hajonnan aiheuttava raakatuotteen radiokemiallisen saannon lasku poikkeus yhdessä reaktiossa.

[¹⁸F]FPATPP:a on valmistettu aiemmin ruteniumvälitteisesti, mutta haasteena on ollut korkea Ru-pitoisuus lopputuotteessa.⁶⁵ Tähän haasteeseen pystytään vastaamaan Cu-välitteisellä radioleimauksella, koska kuparilla on korkeampi sallittu parenteraalisen altistumisen raja 340 µg/päivä.⁶⁶ Puhdistetusta lopputuotteesta tulisi jatkossa määrittää kuparijäämät. Lisäksi Cu-välitteisessä ¹⁸F-leimauksessa reaktio-olosuhteet olivat maltillisemmat verrattuna Ru-välitteiseen ¹⁸F-leimaukseen.

Mikäli valmistettua merkkiainetta käytettäisiin kuvantamiseen, injisoitavan formuloidun merkkiaineen määrän tulisi olla korkea alhaisen molaarisen aktiivisuuden vuoksi. Tämä voisi johtaa CB1-reseptoreiden miehitykseen ei-radioaktiivisen yhdisteen toimesta ja heikentää PET-kuvan laatua. Lisäksi lopputuotteessa havaittu [¹⁸F]fluoridi aiheuttaisi vääristymää kuvantamistulokseen sen kertyessä luihin.

4. Materiaalit ja menetelmät

4.1. Yleiset menetelmät

Lähtöaine (3*R*,5*R*)-5-(3-bromifenyyl)-3-[(*R*)-1-fenyylieetyliamino]-1-(4-trifluorimetyylifenyyl)-pyrrolidiini-2-oni (**23**) valmistettiin mukailemalla Donohue et al. kehittämää FMPEP-*d*₂ synteesiä.⁵⁶ Lopputuote ja kaikki välituotteet karakterisoitiin NMR-spektroskopiolla käyttäen Bruker Avance-III 500MHz -laitetta. Reaktioiden onnistuminen testattiin pienemmässä skaalassa ennen siirtymistä toteutuneisiin määriin. Pylväskromatografisessa puhdistuksessa käytettiin TLC-menetelmää isomeerien erottumisen seurantaan ja oikeaan fraktiointiin. Käytetyt TLC-levyt olivat TLC Silica gel 60 F₂₅₄ ja eluentina käytettiin EtOAc/Heksaani 1:4. Synteeseissä käytetyt kemikaalit olivat kaupallisesti hankittuja.

4.2. Lähtöaineen synteesi

4.2.1. 5-(3-Bromifenyyl)-1-(4-trifluorimetyylifenyyl)-3-(4-trifluorimetyylifenyyl-amino)-1,5-dihydropyrrol-2-oni (**24**)

3-bromibentsaldehydiä (10,0 ml, 85,7 mmol) lisättiin 100 % etikkahappoon (80 ml). Liuokseen lisättiin 4-aminobentsotrifluoridia (32,3 ml, 257,3 mmol). Seokseen lisättiin etyylipyruvaattia (9,45 ml, 85,4 mmol) ja sekoitettiin huoneenlämmössä 23 h. Kellertävä saos suodatettiin ja pestiin 20 % MTBE/heptaani -liuoksella ja kuivattiin imussa, jolloin saatiin lähes valkoinen jauhe **24** (34,2 g, 73 %). ¹H NMR (500MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.70 (s, 1H), 7.89 (d, 2H, *J* = 8.5 Hz), 7.74 (d, 2H, *J* = 8.5 Hz), 7.61 (s, 1H), 7.57 (d, 2H, *J* = 8.5 Hz), 7.49 (d, 2H, *J* = 8.5 Hz), 7.45-7.43 (m, 1H), 7.25 (t, 2H, *J* = 2.5 Hz), 6.65 (d, 1H, *J* = 2.5 Hz), 6.24 (d, 2H, *J* = 2.5 Hz).

4.2.2. 5-(3-Bromifenyyl)-1-(4-trifluorimetyylifenyyl)-pyrrolidiini-2,3-dioni (**25**)

Yhdistettä **24** (34,2 g, 63,1 mmol), 100 % etikkahappoa (160 ml) ja 37 % vetykloridia (200 ml) sekoitettiin 22 h huoneenlämmössä. Heterogeenistä seosta lämmitettiin 60 °C lämpötilassa 1 h. Seos kaadettiin jäiden sekaan, sekoitettiin ja annettiin seistä 1 h. Saos suodatettiin imussa, pestiin vedellä ja kuivattiin vakuumiexsikkaattorissa. Lähtöaineen poistamiseksi lisättiin 100 % etikkahappoa (160 ml) ja 37 % HCl:a (200 ml) ja sekoitettiin huoneenlämmössä 22 h. Keltaiseen liuokseen jäi tumman oranssia kiinteää ainetta, joka ei liennut. Seos kaadettiin 2 l jäitä, sekoitettiin ja annettiin seistä 1 h. Syntyi vaalean keltainen saos ja oranssit kiinteät paakut pystyttiin murskaamaan. Saos suodatettiin imussa, pestiin ja kuivattiin vakuumiexsikkaattorissa yön yli, jolloin saatiin yhdiste **25**. ¹H NMR (500MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.77 (s, 1H), 7.89 (d, 1H, *J* = 9.0 Hz), 7.81 (d, 2H, *J* =

8,5 Hz), 7.76 (d, 1H, $J = 4.0$ Hz), 7.75 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz), 7.69 (d, 2H, $J = 8.5$ Hz), 7.56 (d, 1H, $J = 9.0$ Hz), 7.52 (1H), 7.49 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz), 7.44 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz), 7.25 (t, 2H, $J = 8.0$ Hz), 7.21 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz), 6.66 (d, 1H, $J = 3.0$ Hz), 6.24 (d, 1H, $J = 3.0$ Hz), 6.03 (d, 1H, $J = 3.0$ Hz), 6.00 (d, 1H, $J = 2.5$ Hz), 5.80 (dd, 1H, $J = 7.5, 4.5$ Hz), 3.38 (m, 1H), 2.73 (dd, 1H, $J = 13.0, 8.0$ Hz).

4.2.3. (R)-5-(3-Bromifenyli)-3-[(R)-1-fenylietyyliamino]-1-(4-trifluorimetyylifenyyli)-1,5-dihydropyrrol-2-oni (26)

(R)-(+)-1-fenylietyyliamiinia (6,41 ml, 50,4 mmol) lisättiin yhdisteen **25** (10 g, 25,2 mmol) ja CH₂Cl₂ (63,7 ml) liuokseen. Liuosta sekoitettiin huoneenlämmössä 18 h. Tummanruskea liuos haihdutettiin pyöröhaihduttajalla kuiviin. Tummanruskea öljymäinen haihdutusjäännös liuotettiin mahdollisimman pieneen määrään EtOAc:ia ja lisättiin silikasta ja heksaanista valmistettuun pylvääseen. Materiaali puhdistettiin pylväskromatografialla (1–15 % EtOAc/heksaani), jolloin saatiin toisena eluoitunut isomeeri **26**, vaaleanpunainen öljy (1,28 g, 10 %). ¹H NMR (500MHz, DMSO-*d*₆): δ 7.79 (d, 2H, $J = 8.5$ Hz), 7.67 (d, 2H, $J = 8.5$ Hz), 7.35 (d, 2H, $J = 7.5$ Hz), 7.30 (d, 1H, $J = 9.0$ Hz), 7.28-7.25 (m, 2H), 7.22 (1H), 7.17-7.14 (m, 1H), 7.11 (t, 1H, $J = 8.0$ Hz), 7.01 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz), 5.93 (d, 1H, $J = 7.5$ Hz), 5.90 (d, 1H, $J = 2.5$ Hz), 5.19 (d, 1H, $J = 2.5$ Hz), 4.36-4.31 (m, 1H), 1.4 (d, 3H, $J = 7.0$ Hz).

4.2.4. (3R,5R)-5-(3-Bromifenyli)-3-[(R)-1-fenylietyyliamino]-1-(4-trifluorimetyylifenyyli)-pyrrolidiini-2-oni (27)

Natriumsyanoboorihydridi (211 mg, 3,36 mmol) lisättiin reaktioastiaan yhdisteen **26** (0,84 g, 1,68 mmol) kanssa. Reaktioastiaan lisättiin 100 % etikkahappoa (8,4 ml) ja sekoitettiin huoneenlämmössä 1 h. Reaktion suojakaasuna käytettiin argonia. Liuos lisättiin hitaasti kylläiseen NaHCO₃ -vesiliuokseen. Liuokseen lisättiin etyyliasetaattia, pestiin vedellä ja kylläisellä NaCl -vesiliuoksella. Liuosta kuivattiin natriumsulfaatilla ja haihdutettiin kuiviin pyöröhaihduttajalla. Vaalean keltaiset kiteet liuotettiin pieneen määrään etyyliasetaattia ja lisättiin silikasta ja heksaanista valmistettuun pylvääseen. Materiaali puhdistettiin pylväskromatografialla (3–30 % EtOAc/heksaani), jolloin saatiin ensimmäisenä eluoitunut isomeeri **27**, valkoisia kiteitä (631 mg, 74 %). ¹H NMR (500MHz, DMSO-*d*₆): δ 7.62 (d, 2H, $J = 8.5$ Hz), 7.53 (d, 3H, $J = 8.5$ Hz), 7.36 (d, 3H, $J = 7.5$ Hz), 7.29-7.32 (m, 2H), 7,25 (d, 1H, $J = 7.5$ Hz), 7.23-7.19 (m, 2H), 5.27-5.24 (m, 1H), 4.38-4.34 (m, 1H), 3.44-3.43 (m, 1H), 2.77 (br, 1H), 2.49-2.45 (m, 1H), 1.57-1.51 (m, 1H), 1.31 (d, 3H, $J = 7.0$ Hz).

4.2.5. (3*R*,5*R*)-5-(3-Trimetyylistannyyli-fenylyli)-3-[(*R*)-1-fenylylietyyliamino]-1-(4-trifluorimetyyli-fenylyli)-pyrrolidiini-2-oni (**23**)

Yhdiste **27** (325 mg, 0,65 mmol) ja (PPh₃)PdCl₂ (42,4 mg, 0,06 mmol) lisättiin reaktioastiaan, jossa käytettiin suojakaasuna argonia. Reaktioastiaan lisättiin kuivaa toluenia (10 ml) ja heksametyyliditina (0,27 ml, 1,29 mmol). Sekoitettiin 120 °C lämpötilassa yön yli. Reaktioseoksen annettiin jäähtyä ja mustaan seokseen lisättiin vettä ja etyyliasetaattia. Orgaanista faasia pestiin vedellä, kylläisellä NaCl -vesiliuoksella ja kuivattiin natriumsulfaatilla. Liuos haihdutettiin kuiviin pyöröhaihduttajalla ja saatiin keltaista öljyä. Silikasta ja heksaanista valmistettiin pylväs ja raakatuote puhdistettiin pylväskromatografialla (1–22 % EtOAc/heksaani), jolloin saatiin ensimmäisenä eluoitunut tuote **23**, vaaleita kiteitä (259 mg, 68 %).

Reaktio suoritettiin toisella menetelmällä lisäämällä reaktioastiaan yhdistettä **27** (194 mg, 0,39 mmol) ja (PPh₃)₂PdCl₂ (25 mg, 0,036 mmol). Typpikaasulla suojattuun reaktioastiaan lisättiin kuivaa toluenia (10 ml) ja heksametyyliditina (0,16 ml, 0,77 mmol). Sekoitettiin 120 °C lämpötilassa yön yli. Reaktioseoksen annettiin jäähtyä ja se huuhdeltiin metanolilla suodattimeen, jossa oli metanolilla kasteltu Celite®545. Suodatettu liuos haihdutettiin kuiviin pyöröhaihduttajalla ja saatiin tummanruskeaa öljyä. Silikasta ja heksaanista valmistettiin pylväs ja raakatuote puhdistettiin pylväskromatografialla (1–25 % EtOAc/heksaani), jolloin saatiin ensimmäisenä eluoitunut tuote **23**, valkoisia kiteitä (142 mg, 62 %). ¹H NMR (500MHz, DMSO-*d*₆): δ 7.59 (d, 2H, *J* = 8.5 Hz), 7.51 (d, 2H, *J* = 8.5 Hz), 7.37 (d, 2H, *J* = 7.0 Hz), 7.30 (t, 2H, *J* = 7.5 Hz), 7.29 (s, 1H), 7.27-7.25 (m, 1H), 7.23-7.18 (m, 2H), 7.16-7.14 (m, 1H), 5.24-5.21 (m, 1H), 4.33-4.31 (m, 1H), 3.48-3.43 (m, 1H), 2.72-2.70 (m, 1H), 2.45-2.41 (m, 1H), 1.56-1.49 (m, 1H), 1.31 (d, 3H, *J* = 6.5 Hz), 0.18 (m, 9H).

4.3. Radiokemian yleiset menetelmät

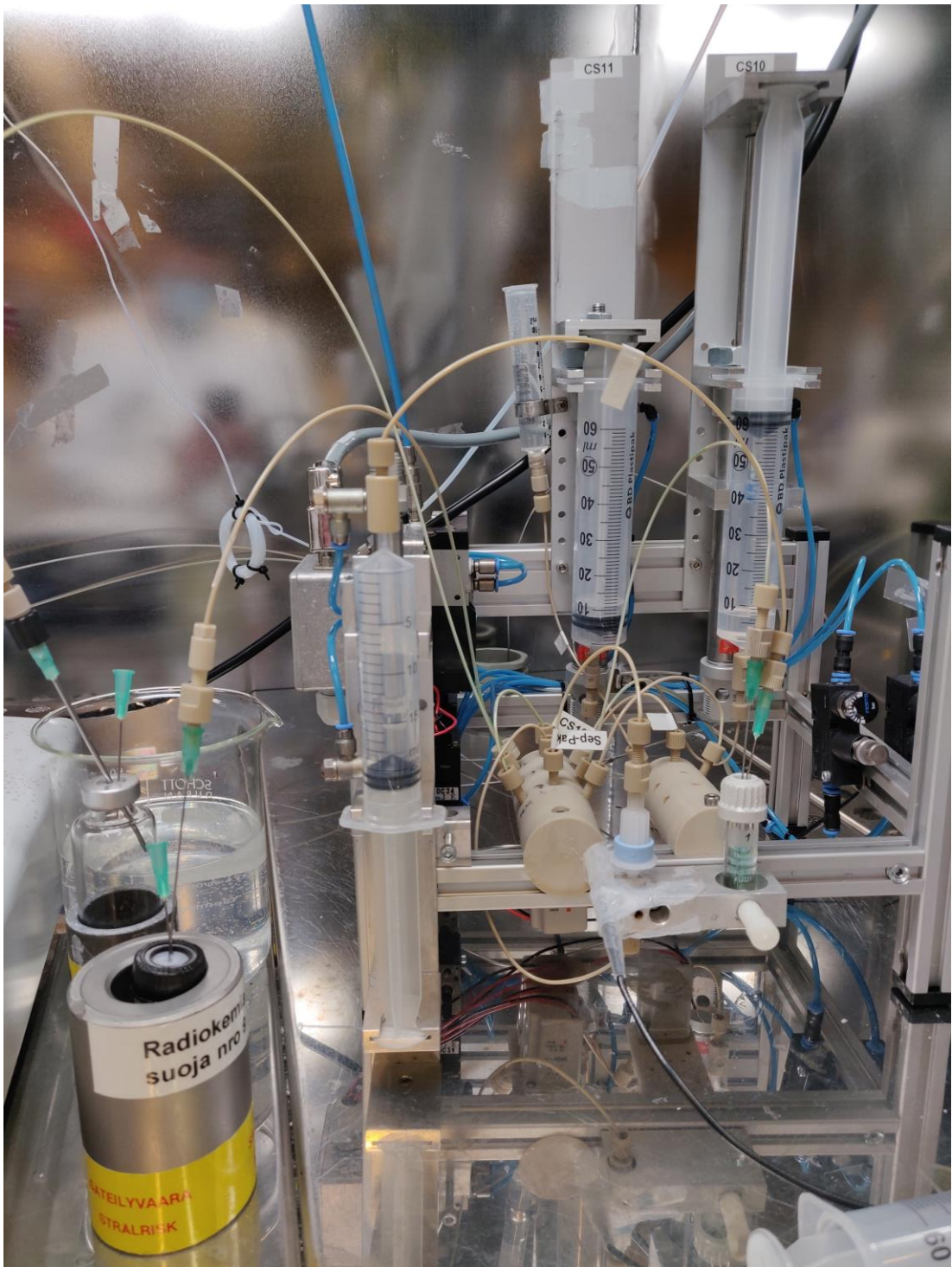
Radiokemialliset saannot ja molaariset aktiivisuudet puoliintumisaikakorjattiin säteilytyksen loppuhetkeen. Tuotteiden oikeellisuus, radiokemiallinen saanto ja puhtaus määritettiin radioHPLC-menetelmällä. Referenssinä käytettiin stabiilia FPATPP yhdistettä. Raakatuotteiden radiokemialliset saannot perustuvat radioHPLC-ajoihin. HPLC-kolonnilta eluoitunut radioaktiivisuus mitattiin kokonaisuudessaan ja tuotteen fraktio kerättiin erikseen mittausta varten.

Semipreparatiivisessa HPLC-puhdistuksessa käytettiin Jasco PU-2089 Plus HPLC-pumppua ja Luna C18 kolonnia (10 μm, 10,0 mm × 250 mm). Isokraattisessa metodissa eluettina käytettiin 57/43 1 % TFA:a H₂O/CH₃CN:ssä + askorbiinihappo (500 mg/ml).

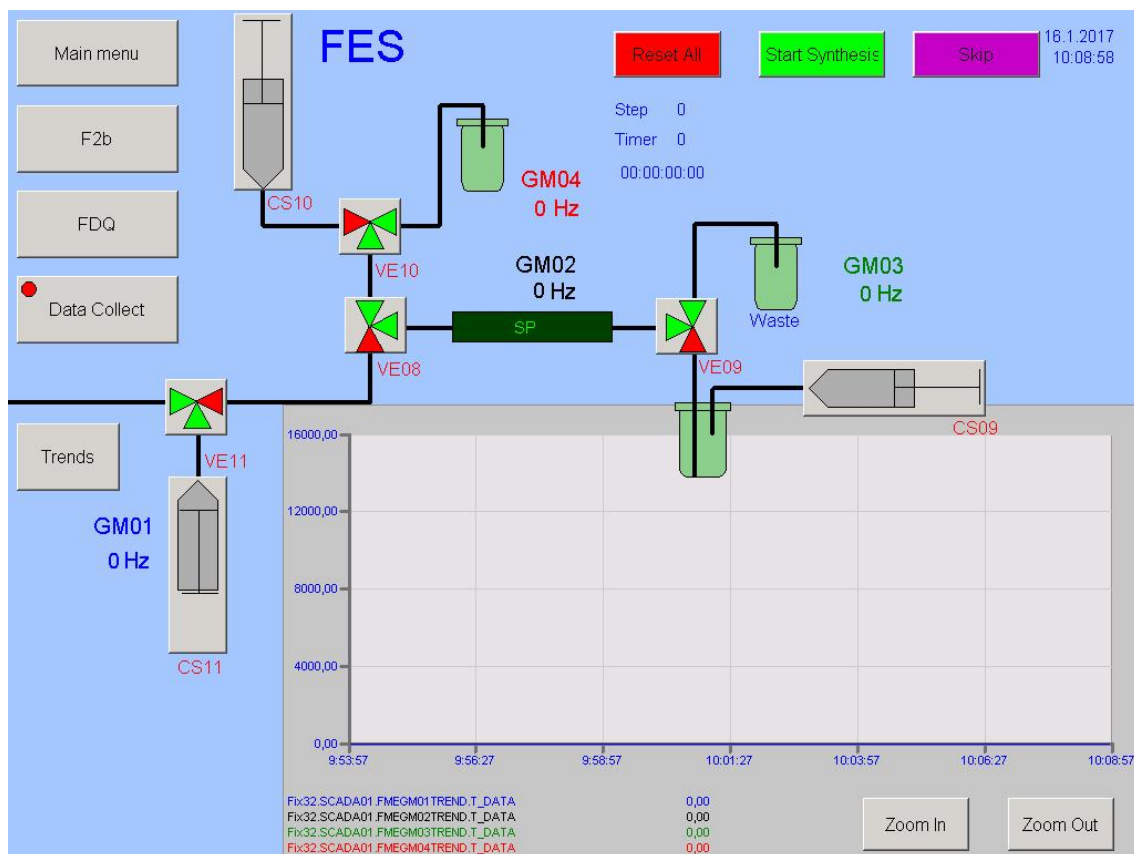
Virtausnopeus oli 8 ml/min ja UV-detektorin aallonpituus $\lambda = 254$ nm. Analyyttiseen radioHPLC-määritykseen käytettiin VWR Hitachi L-2130 HPLC-pumppua, VWR Hitachi L-2400 UV-detektoria ja NaI-kiteeseen perustuvaa tuikeilmaisinta. Isokraattisessa metodissa eluentina käytettiin 55/45 0,1 % TFA:a H₂O/CH₃CN:ssä ja Luna C5 kolonnia (5 μ m, 4,6 mm \times 150 mm, 100 Å). Virtausnopeus oli 0,95 ml/min ja UV-detektorin aallonpituus $\lambda = 254$ nm.

4.4. Radioleimaus

[¹⁸F]F⁻ (aq) valmistettiin syklotronilla säteilyttämällä ¹⁸O-rikastettua vettä protoneilla. Kohtiolta kuumakemiakammioon siirretty fluoridi oli solvatoituneena vesiliuokseen ja nukleofiilisyyden parantamiseksi siitä poistettiin vesi. Aktivointi suoritettiin kahdella eri menetelmällä, kiinteäfaasiuutolla (SPE) ja atseotrooppisella tislauksella. Synteetit tehtiin kuumakemiakammioissa. SPE-menetelmää käytettäessä [¹⁸F]fluoridin aktivointiin, synteeseissä käytettiin PET-keskuksessa rakennettua synteasilaitetta (kuva 19). Synteasilaitetta ohjattiin kuumakemiakammion ulkopuolelta ohjausyksikön avulla (kuva 20).



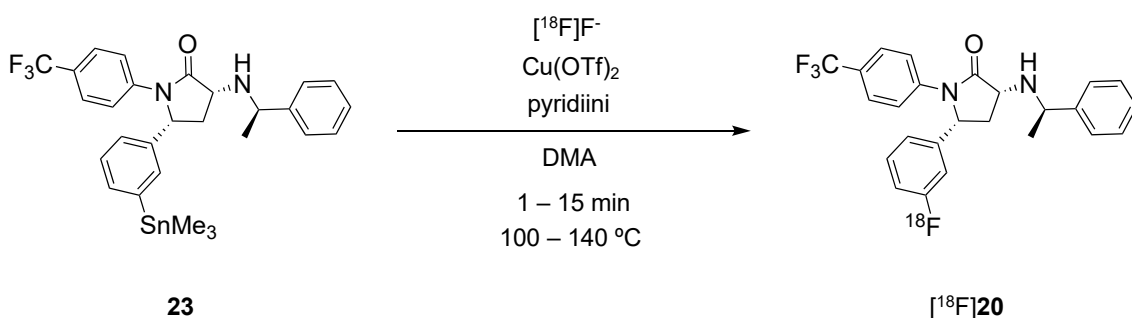
Kuva 19. Synteesilaitte synteesivalmiina kuumakemiakammiossa.



Kuva 20. Synteesilaitteen ohjausyksikön näkymä.

4.4.1. [^{18}F]FPATPP synteesi kiinteäfaasiuutolla

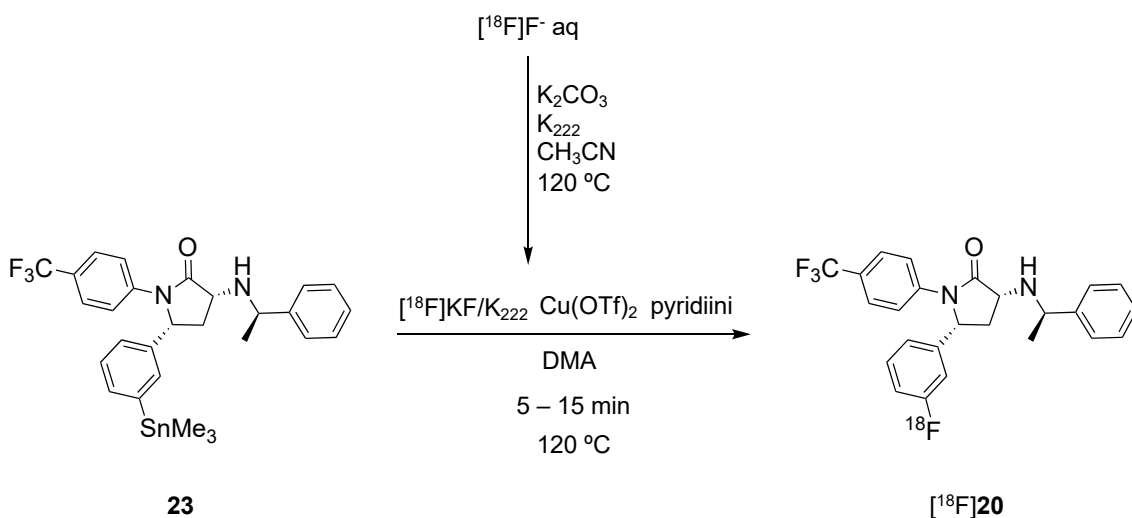
SPE-aktivoinnissa [^{18}F]fluoridi kiinnitettiin ioninvaihtopatruunaan (Sep-Pak QMA Light, Waters), joka oli aktivoitu ennen synteesiä litiumtriflaatilla (aq) (10 ml, 0,1 M) ja vedellä (20 ml). Patruuna huuhdeltiin veden poistamiseksi dimetyyliasetamidilla (5 ml). [^{18}F]F $^-$ eluoitiin patruunasta DMA:in (0.5 ml) liuotetun kuparitriflaatin ($17,8 \pm 0,2$ mg) avulla reaktioastiaan, jossa oli DMA:in (50 μl) liuotettu lähtöaine **23** ($4,8 \pm 0,2$ mg) ja pyridiini (50 μl). Radioaktiivisuuden irtoamista ioninvaihtopatruunasta seurattiin Geiger-Müller-putkilla. Radioleimausreaktiot tehtiin 100 °C, 120 °C ja 140 °C lämpötiloissa. Reaktioajat olivat 1, 5 ja 15 min jokaisessa lämpötilassa. Jokaisesta reaktiosta kerättiin näyte (5–20 μl) radioHPLC:tä varten. Näytteet liuotettiin HPLC-eluenttiin (200 μl). 120 °C, 15 min reaktiosta jatkettiin semipreparatiiviseen puhdistukseen tuotteen radiokemiallisen saannon määrittämiseksi ja reaktioseos liuotettiin 1 % TFA:a (aq) (1,0 ml). Semipreparatiivista puhdistusta jatkettiin radioHPLC-analyysi.



Kuva 21. [^{18}F]FPATPP:n ($[^{18}\text{F}]20$) kuparivälitteinen ^{18}F -fluorointi käyttäen kiinteäfaasiuuttoa [^{18}F]fluoridin aktivointiin.

4.4.2. [^{18}F]FPATPP synteesi atseotrooppisen tislauksen menetelmällä

Atseotrooppisen tislauksen menetelmässä [^{18}F]fluoridi (aq) kuivattiin atseotrooppisella tislauksella asetonitriiliin ja heliumvirtauksen avulla. Tislaus suoritettiin 120 °C lämpötilassa 8 + 5 + 5 min ja 1, 1 ja 0,5 ml CH_3CN :n lisäyksillä. Reaktioastiassa oli [^{18}F]fluoridin (aq) lisäksi MeCN :n (100 μl) liuotetut K_2CO_3 (2,3 mg) ja Kryptofix K_{222} (6,9 mg). Tästä muodostuneen kuivan [^{18}F]FK/ K_{222} -kompleksin sisältävään reaktioastiaan lisättiin DMA :in (0,5 ml) liuotettu $\text{Cu}(\text{OTf})_2$ (8,9 mg), pyridiini (50 μl) ja DMA :in (50 μl) liuotettu lähtöaine **23** (4,5 mg). Radioleimausreaktio suoritettiin 120 °C lämpötilassa 5 ja 15 min reaktioajoilla. Molemmista reaktioista kerättiin näyte (10–20 μl) radioHPLC:tä varten. Näytteet liuotettiin HPLC-eluenttiin (200 μl). 15 min reaktiosta jatkettiin semipreparatiiviseen puhdistukseen ja reaktioseos liuotettiin 0,1 % TFA :a (aq) (1,0 ml). Semipreparatiivista puhdistusta seurasi radioHPLC-analyysi.



Kuva 22. [^{18}F]FPATPP:n ($[^{18}\text{F}]20$) kuparivälitteinen ^{18}F -fluorointi käyttäen atseotrooppista tislauksella [^{18}F]fluoridin aktivointiin.

5. Viitteet

- (1) Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, Devane WA, Felder CC, Herkenham M, Mackie K, Martin BR, Mechoulam R, Pertwee RG: International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of Cannabinoid Receptors. *Pharmacolo Rev.* **2002**, 54: 161–202.
- (2) Shahbazi F, Grandi V, Banerjee A, Trant JF: Cannabinoids and Cannabinoid Receptors: The Story so Far. *iScience.* **2020**, 23
- (3) Mechoulam R, Parker LA: The Endocannabinoid System and the Brain. *Annu Rev of Psychol.* **2013**, 64: 21–47.
- (4) Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M: Molecular Characterization of a Peripheral Receptor for Cannabinoids. *Nature.* **1993**, 365: 61–65.
- (5) Mackie K: Cannabinoid Receptors: Where They Are and What They Do. *J Neuroendocrinol.* **2008**, 20: 10–14.
- (6) Glass M, Dragunow M, Faull R: Cannabinoid Receptors in the Human Brain: A Detailed Anatomical and Quantitative Autoradiographic Study in the Fetal, Neonatal and Adult Human Brain. *Neuroscience.* **1997**, 77: 299–318.
- (7) Herkenham M, Lynn AB, Litrle MD, Johnsont MR, Melvin LS, De Costa BR, Riceo KC: Cannabinoid Receptor Localization in Brain (Tetrahydrocannabinol/Autoradiography/Basal Ganglia/Hippocampus/Cerebeilum). *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* **1990**, 87: 1932–1963
- (8) Westlake TM, Howlett AC, Bonner TI, Matsuda LA, Herkenham M: Cannabinoid Receptor Binding and Messenger RNA Expression in Human Brain: An *in Vitro* Receptor Autoradiography and *in Situ* Hybridization Histochemistry Study of Normal Aged and Alzheimer’s Brains. *Neuroscience.* **1994**, 63: 637–652.
- (9) Pertwee RG: Pharmacology of Cannabinoid CB1 and CB2 Receptors. *Pharmacol Ther.* **1997**, 74: 129–180.
- (10) Piomelli D: The Molecular Logic of Endocannabinoid Signalling. *Nat Rev Neurosci.* **2003**, 4: 873–884.
- (11) Mechoulam R, Parker LA: The Endocannabinoid System and the Brain. *Annu Rev Psychol.* **2013**, 64: 21–47.
- (12) Eggan, SM, Hashimoto T, Lewis DA: Reduced Cortical Cannabinoid 1 Receptor Messenger RNA and Protein Expression in Schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry.* **2008**, 65: 772–784.

- (13) Fattore L: Cannabinoids in Neurologic and Mental Disease, Elsevier Inc. **2015**; pp 15–33.
- (14) Howlett AC: The Cannabinoid Receptors. *Prostaglandins Other Lipid Mediators* **2002**, 68–69: 619–631.
- (15) Ohno-Shosaku T, Tanimura A, Hashimoto-dani Y, Kano M: Endocannabinoids and Retrograde Modulation of Synaptic Transmission. *Neuroscientist*. **2012**, 18: 119–132.
- (16) Baker D, Pryce G, Giovannoni G, Thompson AJ: The Therapeutic Potential of Cannabis. *Lancet Neurology*. **2003**, 2: 291–298.
- (17) Katona I, Freund TF: Endocannabinoid Signaling as a Synaptic Circuit Breaker in Neurological Disease. *Nature Medicine*. **2008**, 14: 923–930.
- (18) Di Marzo V: New Approaches and Challenges to Targeting the Endocannabinoid System. *Nat Rev Drug Discovery*. **2018**, 17: 623–639.
- (19) Dinh TP, Carpenter D, Leslie FM, Freund TF, Katona I, Sensi SL, Kathuria S, Piomelli D: Brain Monoglyceride Lipase Participating in Endocannabinoid Inactivation. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* **2002**, 99: 10819–10824.
- (20) Ueda N, Tsuboi K, Uyama T: Metabolism of Endocannabinoids and Related *N*-Acylethanolamines: Canonical and Alternative Pathways. *FEBS J.* **2013**, 280: 1874–1894.
- (21) Howlett A, Blume L, Dalton G: CB1 Cannabinoid Receptors and Their Associated Proteins. *Curr Med Chem*. **2010**, 17: 1382–1393.
- (22) Hua T, Vemuri K, Pu M, Qu L, Han GW, Wu Y, Zhao S, Shui W, Li S, Korde A, Laprairie, RB, Stahl EL, Ho JH, Zvonok N, Zhou H, Kufareva I, Wu B, Zhao Q, Hanson MA, Bohn LM, Makriyannis A, Stevens RC, Liu ZJ: Crystal Structure of the Human Cannabinoid Receptor CB1. *Cell*. **2016**, 167: 750-762.
- (23) Hargreaves RJ, Rabiner EA: Translational PET Imaging Research. *Neurobiol Dis.* **2014**, 61: 32–38.
- (24) Levin CS: Primer on Molecular Imaging Technology. *Eur J Nuc Med Mol Imaging*. **2005**, 32: 325–345.
- (25) Laruelle M, Slifstein M, Huang Y: Relationships between Radiotracer Properties and Image Quality in Molecular Imaging of the Brain with Positron Emission Tomography. *Mol Imaging Biol.* **2003**, 5: 363–375.
- (26) Cheng HC, The Power Issue: Determination of K_B or K_i from IC_{50} - A Closer Look at the Cheng-Prusoff Equation, the Schild Plot and Related Power Equations. *J Pharmacol Toxicol Methods*. **2001**, 46: 61–71.

- (27) Ametamey SM, Honer M, Schubiger PA: Molecular Imaging with PET. *Chem Rev.* **2008**, 108: 1501–1516.
- (28) Welch MJ, Chi DY, Mathias CJ, Kilbourn MR, Brodack JW, Katzenellenbogen JA: Biodistribution of *N*-Alkyl and *N*-Fluoroalkyl Derivatives of Spiroperidol; Radiopharmaceuticals for PET Studies of Dopamine Receptors. *Int J Rad Appl Instrum.* **1986**, 13: 523–526.
- (29) Waterhouse RN: Determination of Lipophilicity and Its Use as a Predictor of Blood-Brain Barrier Penetration of Molecular Imaging Agents. *Mol Imaging Biol.* **2003**, 5: 376–389.
- (30) Wilson AA, Jin L, Garcia A, DaSilva JN, Houle S: An Admonition When Measuring the Lipophilicity of Radiotracers Using Counting Techniques. *Appl Radiat Isot.* **2001**, 54: 203–208.
- (31) SRSST Radiopharmaconnect. Do You Care about Molar Activity? *Authorea.* **2019**.
- (32) Keller T, López-Picón FR, Krzyczmonik A, Forsback S, Takkinen JS, Rajander J, Teperi S, Dollé F, Rinne JO, Haaparanta-Solin M, Solin O: Comparison of High and Low Molar Activity TSPO Tracer [¹⁸F]F-DPA in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J Cereb Blood Flow Metab.* **2020**, 40: 1012–1020.
- (33) Savisto N, Bergman J, Aromaa J, Forsback S, Eskola O, Viljanen T, Rajander J, Johansson S, Grigg J, Luthra S, Solin O: Influence of Transport Line Material on the Molar Activity of Cyclotron Produced [¹⁸F]Fluoride. *Nucl Med Biol.* **2018**, 64–65: 8–15.
- (34) Böhm HJ, Banner D, Bendels S, Kansy M, Kuhn B, Müller K, Obst-Sander U, Stahl M: Fluorine in Medicinal Chemistry. *ChemBioChem.* 2004, 5: 637–643.
- (35) Conti M, Eriksson L: Physics of Pure and Non-Pure Positron Emitters for PET: A Review and a Discussion. *EJNMMI Physics.* **2016**, 3: 1–17.
- (36) Gaoni Y, Mechoulam R: Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish. *J Am Chem Soc.* **1964**, 86: 1646–1647.
- (37) Charalambous A, Marciniak G, Shiue CY, Dewey SL, Schlyer DJ, Wolf AP, Makriyannis A: PET Studies in the Primate Brain and Biodistribution in Mice Using (-)-5'-¹⁸F- Δ^8 -THC. *Pharmacology, Biochem Behav.* **1991**, 40: 503–507.
- (38) Rinaldi-Carmona M, Barth F, Héaulme M, Shire D, Calandra B, Congy C, Martinez S, Maruani J, Néliat G, Caput D, Ferrara P, Soubrié P, Brelière JC, Le Fur G: SR141716A, a Potent and Selective Antagonist of the Brain Cannabinoid Receptor. *FEBS Lett.* **1994**, 350: 240–244.

- (39) Sam AH, Salem V, Ghatei MA: Rimonabant: From RIO to Ban. *J Obes.* **2011**, 2011.
- (40) Mathews WB, Scheffel U, Rauseo PA, Raver HT, Frank RA, Ellames GJ, Herbert JM, Barth F, Rinaldi-Carmona M, Dannals RF: Carbon-11 Labeled Radioligands for Imaging Brain Cannabinoid Receptors. *Nucl Med Biol.* **2002**, 29: 671–677.
- (41) Mathews WB, Scheffel U, Finley P, Ravert HT, Frank RA, Rinaldi-Carmona M, Barth F, Dannals RF: Biodistribution of [¹⁸F] SR144385 and [¹⁸F] SR147963: Selective Radioligands for Positron Emission Tomographic Studies of Brain Cannabinoid Receptors. *Nucl Med Biol.* **2000**, 27: 757–762.
- (42) Mathews WB, Ravert HT, Musachio JL, Frank RA, Rinaldi-Carmona M, Barth F, Dannals RF: Synthesis of [¹⁸F] SR144385: a selective radioligand for positron emission tomographic studies of brain cannabinoid receptors. *J Label Compd Radiopharm.* **1999**, 42: 589–596
- (43) Li Z, Gifford A, Liu Q, Thotapally R, Ding YS, Makriyannis A, Gatley SJ: Candidate PET Radioligands for Cannabinoid CB1 Receptors: [¹⁸F]AM5144 and Related Pyrazole Compounds. *Nucl Med Biol.* **2005**, 32: 361–366.
- (44) Fan H, Ravert HT, Holt DP, Dannals RF, Horti AG: Synthesis of 1-(2,4-Dichlorophenyl)-4-Cyano-5-(4-[¹¹C] Methoxyphenyl)-N-(Piperidin-1-Yl)-1H-Pyrazole-3-Carboxamide ([¹¹C]JHU75528) and 1-(2-Bromophenyl)-4-Cyano-5-(4-[¹¹C]Methoxyphenyl)-N-(Piperidin-1-Yl)-1H-Pyrazole-3-Carboxamide ([¹¹C]JHU75575) as Potential Radioligands for PET Imaging of Cerebral Cannabinoid Receptor. *J Label Compd Radiopharm.* **2006**, 49: 1021–1036.
- (45) Horti AG, Fan H, Kuwabara H, Hilton J, Ravert HT, Holt DP, Alexander M, Kumar A, Rahmim A, Scheffel U, Wong DF, Dannals RF: C-JHU75528: A Radiotracer for PET Imaging of CB1 Cannabinoid Receptors. *J Nucl Med.* **2006**, 47: 1689–1696
- (46) Fan H, Kotsikorou E, Hoffman AF, Ravert HT, Holt D, Hurst DP, Lupica CR, Reggio PH, Dannals RF, Horti AG: Analogs of JHU75528, a PET Ligand for Imaging of Cerebral Cannabinoid Receptors (CB1): Development of Ligands with Optimized Lipophilicity and Binding Affinity. *Eur J Med Chem.* **2009**, 44: 593–608.
- (47) Wong DF, Kuwabara H, Horti A, Kumar A, Brasic J, Ye W, Alexander M, Raymond V, Galecki J, Charlotte M, Cascella N: PET Imaging of Cannabinoid

- CB1 Type Receptors in Healthy Humans and Patients with Schizophrenia Using [¹¹C]OMAR. *NeuroImage*. **2008**, 41: T51
- (48) Wong DF, Kuwabara H, Horti AG, Raymont V, Brasic J, Guevara M, Ye W, Dannals RF, Ravert HT, Nandi A, Rahmim A, Ming JE, Grachev I, Roy C, Cascella N: Quantification of Cerebral Cannabinoid Receptors Subtype 1 (CB1) in Healthy Subjects and Schizophrenia by the Novel PET Radioligand [¹¹C]OMAR. *NeuroImage*. **2010**, 52: 1505–1513.
- (49) Burns, HD, Van Laere K, Sanabria-Bohórquez S, Hamill TG, Bormans G, Eng WS, Gibson R, Ryan C, Connolly B, Patel S, Krause S, Vanko A, Van Hecken A, Dupont P, De Lepeleire I, Rothenberg P, Stoch SA, Cote J, Haggmann WK, Jewell JP, Lin LS, Liu P, Goulet MT, Gottesdiener K, Wagner J, De Hoon J, Mortelmans L, Fong TM, Hargreaves RJ: [¹⁸F]MK-9470, a Positron Emission Tomography (PET) Tracer for in Vivo Human PET Brain Imaging of the Cannabinoid-1 Receptor. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* **2007**, 104: 9800–9805.
- (50) Van Laere K, Goffin K, Casteels C, Dupont P, Mortelmans L, De Hoon J, Bormans G: Gender-Dependent Increases with Healthy Aging of the Human Cerebral Cannabinoid-Type 1 Receptor Binding Using [¹⁸F]MK-9470 PET. *NeuroImage*. **2008**, 39: 1533–1541.
- (51) Ceccarini J, Kuepper R, Kemels D, Van Os J, Henquet C, Van Laere K: [¹⁸F]MK-9470 PET Measurement of Cannabinoid CB1 Receptor Availability in Chronic Cannabis Users. *Addict Biol.* **2015**, 20: 357–367.
- (52) Thomae D, Morley TJ, Hamill T, Carroll VM, Papin C, Twardy NM, Sharon Lee H, Hargreaves R, Baldwin RM, Tamagnan G, Alagille D: Automated One-Step Radiosynthesis of the CB1 Receptor Imaging Agent [¹⁸F]MK-9470. *J Label Compd Radiopharm* **2014**, 57: 611–614.
- (53) Donohue SR, Pike VW, Finnema SJ, Truong P, Andersson J, Gulyás B, Halldin C: Discovery and Labeling of High-Affinity 3,4-Diarylpyrazolines as Candidate Radioligands for *In Vivo* Imaging of Cannabinoid Subtype-1 (CB1) Receptors. *J Med Chem.* **2008**, 51: 5608–5616
- (54) Tsujikawa T, Zoghbi SS, Hong J, Donohue SR, Jenko KJ, Gladding RL, Halldin C, Pike VW, Innis RB, Fujita M: *In Vitro* and *in Vivo* Evaluation of ¹¹C-SD5024, a Novel PET Radioligand for Human Brain Imaging of Cannabinoid CB1 Receptors. *NeuroImage*. **2014**, 84: 733–741.
- (55) Yasuno F, Brown AK, Zoghbi SS, Krushinski JH, Chernet E, Tauscher J, Schaus JM, Phebus LA, Chesterfield AK, Felder CC, Gladding RL, Hong J, Halldin C,

- Pike VW, Innis RB, The PET Radioligand [¹¹C]MePPEP Binds Reversibly and with High Specific Signal to Cannabinoid CB1 Receptors in Nonhuman Primate Brain. *Neuropsychopharmacology*. **2008**, 33: 259–269.
- (56) Donohue SR, Krushinski JH, Pike VW, Chernet E, Phebus L, Chesterfield AK, Felder CC, Halldin C, Schaus JM: Synthesis, Ex Vivo Evaluation, and Radiolabeling of Potent 1,5-Diphenylpyrrolidin-2-One Cannabinoid Subtype-1 Receptor Ligands as Candidates for *In Vivo* Imaging. *J Med Chem*. **2008**, 51: 5833–5842
- (57) Terry GE, Liow JS, Zoghbi SS, Hirvonen J, Farris AG, Lerner A, Tauscher JT, Schaus JM, Phebus L, Felder CC, Morse CL, Hong JS, Pike VW, Halldin C, Innis RB: Quantitation of Cannabinoid CB1 Receptors in Healthy Human Brain Using Positron Emission Tomography and an Inverse Agonist Radioligand. *NeuroImage*. **2009**, 48: 362–370.
- (58) Terry GE, Hirvonen J, Liow J-S, Zoghbi SS, Gladding R, Tauscher JT, Schaus JM, Phebus L, Felder CC, Morse CL, Donohue SR, Pike VW, Halldin C, Innis RB: Imaging and Quantitation of Cannabinoid CB 1 Receptors in Human and Monkey Brains Using ¹⁸F-Labeled Inverse Agonist Radioligands. *J Nucl Med*. **2010**, 51: 112–120.
- (59) Hashimoto K, Kojima M, Inoue O, Suzuki K, Yamasaki T: Deuterium Isotope Effect of [¹¹C]N, N-Dimethylphenethyl-Amine- α , α -D₂; Reduction in Metabolic Trapping Rate in Brain. *Int J Rad Appl Inst*. **1986**, 13: 79–80.
- (60) Takkinen JS, López-Picón FR, Kirjavainen AK, Pihlaja R, Snellman A, Ishizu T, Löyttyniemi E, Solin O, Rinne JO, Haaparanta-Solin M: [¹⁸F]FMPEP-*d*₂ PET Imaging Shows Age- and Genotype-Dependent Impairments in the Availability of Cannabinoid Receptor 1 in a Mouse Model of Alzheimer’s Disease. *Neurobiol Aging*. **2018**, 69: 199–208.
- (61) Hirvonen J, Goodwin RS, Li CT, Terry GE, Zoghbi SS, Morse C, Pike VW, Volkow ND, Huestis MA, Innis RB: Reversible and Regionally Selective Downregulation of Brain Cannabinoid CB 1 Receptors in Chronic Daily Cannabis Smokers. *Mol Psychiatry*. **2012**, 17: 642–649.
- (62) Borgan F, Laurikainen H, Veronese M, Marques TR, Haaparanta-Solin M, Solin O, Dahoun T, Rogdaki M, Salokangas RKR, Karukivi M, di Forti M, Turkheimer F, Hietala J, Howes O: *In Vivo* Availability of Cannabinoid 1 Receptor Levels in Patients with First-Episode Psychosis. *JAMA Psychiatry*. **2019**, 76: 1074–1084.

- (63) Lahesmaa M, Eriksson O, Gnad T, Oikonen V, Bucci M, Hirvonen J, Koskensalo K, Teuho J, Niemi T, Taittonen M, Lahdenpohja S, Din MU, Haaparanta-Solin M, Pfeifer A, Virtanen KA, Nuutila P: Cannabinoid Type 1 Receptors Are Upregulated during Acute Activation of Brown Adipose Tissue. *Diabetes*. **2018**, 67: 1226–1236.
- (64) Lahdenpohja S, Keller T, Forsback S, Viljanen T, Kokkomäki E, Kivelä Rv, Bergman J, Solin O, Kirjavainen AK: Automated GMP Production and Long-Term Experience in Radiosynthesis of CB1 Tracer [¹⁸F]FMPEP-*d*₂. *J Labelled Compd Radiopharm*. **2020**, 63: 408–418.
- (65) Lahdenpohja S, Rajala NA, Helin JS, Haaparanta-Solin M, Solin O, López-Picón FR, Kirjavainen AK: Ruthenium-Mediated ¹⁸F-Fluorination and Preclinical Evaluation of a New CB1 Receptor Imaging Agent [¹⁸F]FPATPP. *ACS Chem Neurosci*. **2020**, 11: 2009–2018.
- (66) International Council for Harmonisation Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use: Guideline Q3D (R1) on Elemental Impurities. <https://ich.org> (viitattu Toukokuu 2021).
- (67) Teare H, Robins EG, Kirjavainen A, Forsback S, Sandford G, Solin O, Luthra SK, Gouverneur V: Radiosynthesis and Evaluation of [¹⁸F]Selectfluor Bis(Triflate). *Angew Chem Int Ed Engl*. **2010**, 49: 6821–6824.
- (68) Cai L, Lu S, Pike VW: Chemistry with [¹⁸F]Fluoride Ion. *Eur J Org Chem*. **2008**, 2008: 2853–2873.
- (69) Brodack JW, Kilbourn MR, Welch MJ, Katzenellenbogen JA: NCA 16α-[¹⁸F]Fluoroestradiol-17β: The Effect of Reaction Vessel on Fluorine-18 Resolubilization, Product Yield, and Effective Specific Activity. *Int J Rad Appl Instrum*. **1986**, 37: 217–221.
- (70) Lahdenpohja SO, Rajala NA, Rajander J, Kirjavainen AK: Fast and Efficient Copper-Mediated ¹⁸F-Fluorination of Arylstannanes, Aryl Boronic Acids, and Aryl Boronic Esters without Azeotropic Drying. *EJNMMI Radiopharm Chem*. **2019**, 4: 1–11.
- (71) Beyzavi MH, Mandal D, Strebl MG, Neumann CN, D'Amato EM, Chen J, Hooker JM, Ritter T: ¹⁸F-Deoxyfluorination of Phenols via Ru π-Complexes. *ACS Central Science*. **2017**, 3: 944–948.
- (72) Lee E, Hooker JM, Ritter T: Nickel-Mediated Oxidative Fluorination for PET with Aqueous [¹⁸F] Fluoride. *J Am Chem Soc*. **2012**, 134: 17456–17458.

- (73) Kamlet AS, Neumann CN, Lee E, Carlin SM, Moseley CK, Stephenson N, Hooker JM, Ritter T: Application of Palladium-Mediated ^{18}F -Fluorination to PET Radiotracer Development: Overcoming Hurdles to Translation. *PLoS One*. **2013**, 8: 59187
- (74) Tredwell M, Preshlock SM, Taylor NJ, Gruber S, Huiban M, Passchier J, Mercier J, Génicot C, Gouverneur V: A General Copper-Mediated Nucleophilic ^{18}F Fluorination of Arenes. *Angew Chem Int Ed Engl*. **2014**, 53: 7751–7755.
- (75) Makaravage KJ, Brooks AF, Mossine Av, Sanford MS, Scott PJH: Copper-Mediated Radiofluorination of Arylstannanes with ^{18}F KF. *Org Lett*. **2016**, 18: 5440–5443.
- (76) Mossine Av, Brooks AF, Makaravage KJ, Miller JM, Ichiishi N, Sanford MS, Scott PJH: Synthesis of ^{18}F Arenes via the Copper-Mediated ^{18}F Fluorination of Boronic Acids. *Org Lett*. **2015**, 17: 5780–5783.